

**Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em  
aorta de ratos: Papel do estresse oxidativo, da  
angiotensina II e dos prostanóides da via da  
ciclooxigenase**

**Jhuli Keli Angeli**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas  
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Julho de 2013**

# Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos: Papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxigenase

**Jhuli Keli Angeli**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 29 /07 /2013 por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha – Co-orientadora - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Barros Furieri- UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Ribeiro Moyses- UFES

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira – UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana Hott de Fúcio Lizardo – UFES

Coordenador do PPGCF:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Julho de 2013

---

Jhuli Keli Angeli, Angeli, J.K.

**Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos: Papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxygenase.** [Vitória] 2013.

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cloreto de Cádmio   2. COX   3. Estresse oxidativo   4. Disfunção endotelial

---

“Lembre-se sempre de olhar as coisas de uma outra maneira, o mundo parecerá  
diferente. Se não acreditar, veja.  
Quando pensar que sabe algo, olhe de outra forma,  
Mesmo que pareça tolo ou errado, deve tentar.  
Nunca considere só o que pensa o autor do escrito,  
Considere o que você pensa.  
Tente encontrar sua própria voz.  
Quanto mais demorar em procurar, mais improvável será que encontre.  
Não se resigne. Liberte-se.  
Não fique num canto, olhe a sua volta.  
Ouse ir buscar novos campos.”

***Sociedade do Poetas Mortos***

*Dedico esse trabalho, a minha família pela  
compreensão e carinho; e ao meu Marido, pelo  
companheirismo, amor e amizade.*

.

## **AGRADECIMENTOS**

Até o mais seguro dos homens e a mais confiante das mulheres já passaram por um momento de hesitação, por dúvidas enormes e dúvidas pequenas. Nesta hora, precisamos de um empurrãozinho. E é aos empurradores que dedico estes agradecimentos, a todos aqueles que testemunham os titubeios alheios e dizem: vá em frente!

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre sentir sua presença em meu coração, pela força espiritual e acima de tudo pelas pessoas iluminadas que colocou e coloca em meu caminho a cada dia, tornando-o mais simples diante das dificuldades.

A minha família, meu alicerce. A minha Mãe a quem tanto amo. Pessoa que com sua simplicidade me ensina valores tão essenciais. A meus irmãos Rose, Luciane e Cesar, amigos e incentivadores.

Ao Kleyser, amor, amigo e companheiro. Obrigada pelo incentivo e por sempre participar da minha vida, em especial, obrigada pela paciência de sempre ouvir, ouvir e ouvir o mesmo assunto! Meus sinceros agradecimentos.

Ao Profº Dalton, querido Chefe, obrigada pela orientação, sabedoria e dedicação, imprescindíveis para realização deste trabalho. Além disso, obrigada pela amizade construída ao longo desses anos, pelos conselhos científicos e pessoais e, pela paciência ao longo dessa jornada.

A Profª Alessandra, pela co-orientação, obrigada pelo apoio, por todo carinho e atenção e, pelas contribuições científicas.

A banca, meus agradecimentos, por aceitar realizar a avaliação deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, queridos amigos, grandes incentivadores e motivadores. Divido com vocês os méritos desta conquista, porque ela também pertence a vocês: Fabiana Siman, Fabiana Simões, Camila, Jonaína, Bruna, Thaís, Edna, Paula, Teca, Tati, Mayla, Priscila, Gilson, Mirian, Lorena e aos demais colegas que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Meus agradecimentos especiais a Thaís e a Camila que diretamente me ajudaram na realização dos experimentos.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presente no decorrer dessa jornada, não muito longa, mas intensa. OBRIGADA!

## RESUMO

O Cadmio (Cd) é um metal tóxico, muito utilizado na indústria e um constante componente de fertilizantes agrícolas, o que tem aumentado a contaminação ambiental por este metal. Possui uma estreita ligação com doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e a hipertensão e, além disso, pode induzir um aumento do estresse oxidativo. Um dos principais locais afetados pelo estresse oxidativo é a aorta, o que, conseqüentemente, aumenta o risco para o desenvolvimento de aterosclerose. No entanto, existem poucos relatos de que demonstrem os efeitos agudos do cádmio na aorta. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição “in vitro” ao Cloreto de Cádmio na reatividade vascular e os possíveis mecanismos envolvidos neste processo. Para isso foram utilizados, ratos Wistar machos (250-300g). Os animais foram anestesiados e em seguida, aorta torácica foi removida para dissecação e obtenção de anéis com 3 a 5 mm de comprimento. Anéis controle e anéis previamente incubados com 10 $\mu$ M de Cd foram submetidos à curva concentração-resposta à Fenilefrina (10<sup>-10</sup>-10<sup>-4</sup>M, FE). Avaliaram-se os efeitos do Cd incubando: L-NAME (100 $\mu$ M), apocinina (0,3mM), Superóxido Dismutase (SOD, 150 U/ml), catalase (1000 U ml<sup>-1</sup>), co-incubação (catalase + SOD), enalapril (10  $\mu$ M), losartan (10  $\mu$ M), indometacina (10 $\mu$ M), NS 398 (1  $\mu$ M), SQ 29,548 (1  $\mu$ M), SC 19,220 (10  $\mu$ M) e furegrelato (10  $\mu$ M). Anéis destituídos de endotélio também foram avaliados. Anéis controle e incubados com Cd também foram submetidos à retirada mecânica do endotélio vascular; à curva de acetilcolina (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-5</sup>M, Ach) e de nitroprussiato de sódio (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-5</sup>M, NPS). Além disso, foram realizadas expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS), eNOS fosforilada e receptor AT1. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM e diferença da área abaixo da curva (dAUC%) ou a resposta máxima (Emax) foram avaliados pelo método *teste-t de Student* e quando necessário análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas ou completamente randomizadas, seguida pelo teste *post-hoc* de *Tukey*. (significância  $p < 0.05$ ).

A Emax à FE foi maior em anéis incubados com Cd quando comparados aos controles (Emax, Ct: 102,5  $\pm$  3,4; Cd: 156,1  $\pm$  4,7). A incubação de L-NAME aumentou a reatividade nos anéis em ambos os grupos, porém em menor magnitude nos anéis incubados com Cd (dAUC% Ct x Ct + L-NAME: 117,0  $\pm$  15,3 vs Cd x Cd + L-NAME: 59,7  $\pm$  11,05); a apocinina reduziu a reatividade em ambos os grupos, porém em maior magnitude em anéis incubados com Cd (dAUC% Ct x Apo: 26,72  $\pm$  9,41 vs Cd x apo + Cd: 62,47  $\pm$  6,13); a catalase não alterou significativamente a resposta vascular na presença do Cd; a SOD e a co-incubação SOD + Catalase reduziram a reatividade em anéis incubados com Cd (Emax, Ct: 90,6  $\pm$  8,1; Cd : 113,6  $\pm$  6,4; SOD + Cd: 72,7  $\pm$  8,4; SOD+ Cd+ Cata 71,46  $\pm$  10,56). O losartan não modificou a resposta á fenilefrina em relação aos valores do controle, porém promoveu acentuada diminuição da resposta nos anéis losartan + Cd em relação aos anéis incubados apenas com Cd (Emax, Ct: 103,2  $\pm$  6,2; LOS+ Cd: 111,4  $\pm$  8,2). O mesmo comportamento foi observado após incubação com enalapril. A indometacina não modificou a resposta á fenilefrina em relação aos valores do controle, mas promoveu acentuada diminuição da resposta nos anéis Indo + Cd em relação aos anéis incubados apenas com Cd (Emax, Ct: 88,4  $\pm$  3,6; Indo + Cd: 76,7  $\pm$  5,8). O mesmo comportamento foi observado com os demais inibidores: NS 398



(Emax,Ct:  $92,7 \pm 5,4$ ; NS + Cd:  $84,0 \pm 6,3$ ), SQ 29,548 (Emax,Ct:  $97,2 \pm 6,8$ ; SQ + Cd  $79,0 \pm 7,2$ ), SC 19,220 (Emax,Ct  $97,2 \pm 6,8$ ; SC + Cd  $102,9 \pm 7,6$ ) furegrelato (Emax,Ct  $86,6 \pm 6,1$ ; FURE + Cd  $70,8 \pm 7,3$ ). A remoção endotelial (E-) provocou aumento na resposta à FE em relação aos anéis com endotélio íntegro (E+) em ambos os grupos, mas esse aumento ocorreu em menor magnitude nos anéis (E-) incubados com Cd quando comparados aos E+ incubados com o metal (% dAUC, CT;E+/E-  $147,95 \pm 21,9$  Cd; E+/E-  $67,63 \pm 19,04$ ). O Cd não alterou a resposta vasodilatadora à ACh, nem a resposta ao NPS. A expressão proteica foi semelhante em ambos os grupos controle e cádmio.

Nossos resultados sugerem que o Cd aumenta a Emax à FE através da ação no endotélio vascular. Além disso, os mecanismos responsáveis nesse processo parecem envolver: aumento da biodisponibilidade de angiotensina II e de produtos da COX; diminuição da liberação induzida de NO através do aumento da produção de radicais livres.

Palavras- Chave: Aorta, ROS, COX-2, Sistema renina angiotensina local.

**Agências Patrocinadoras da Pesquisa:** FAPES/CAPES/CNPq

## ABSTRACT

The Cadmium (Cd) is a toxic metal, widely used in industry and is a constant component of agricultural fertilizers, which has increased the environmental contamination by this metal. It has a close connection with cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension, and in addition, it can induce an increase in oxidative stress. One of the main locations affected by oxidative stress are conductance arteries, which consequently, increases the risk for development of atherosclerosis. However, there are few reports evaluating acute effects of cadmium in the aorta. The objective of this study was to evaluate the effects of exposure "in vitro" by Cadmium Chloride on the vascular reactivity and the putative mechanisms involved in this process. Male Wistar rats (250-300g) were used. The animals were anesthetized and then the thoracic aorta was removed and dissected to obtain rings with 3 to 5 mm in length. Control rings and those previously incubated with 10  $\mu$ M Cd underwent concentration-response curve to phenylephrine ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M, FE). We evaluated the effects of L-NAME (100 $\mu$ M), apocynin (0,3mM), superoxide Dismutase (SOD, 150 U/ml), catalase (1000 U ml<sup>-1</sup>), co-incubation (catalase + SOD), enalapril (10  $\mu$ M), losartan (10  $\mu$ M), indomethacin (10 $\mu$ M), NS 398 (1  $\mu$ M), SQ 29,548 (1  $\mu$ M), SC 19,220 (10  $\mu$ M) e furegrelato (10  $\mu$ M) in controls and after Cd incubation. Rings without endothelium were also evaluated. Rings incubated with control and Cd were also subjected to mechanical removal of the vascular endothelium; to increased concentrations of acetylcholine ( $10^{-11}$  a  $10^{-5}$ M, Ach) and sodium nitroprusside ( $10^{-11}$  a  $10^{-5}$ M, NPS). In addition, protein expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) isoform, eNOS phosphorylated and AT1 receptor was measured. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and differences in the area under the curve (dAUC%) or the maximum response (Emax) were evaluated by Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) one way, repeated measures or completely randomized, followed by post-hoc *Tukey* test when necessary ( $p < 0.05$ ).

The Emax for FE was greater in rings incubated with Cd when compared to controls (Emax,Ct: 102,5  $\pm$  3,4; Cd: 156,1  $\pm$  4,7). Incubation with L-NAME increased the reactivity of the rings in both groups, but to a lesser extent in rings incubated with Cd (dAUC% Ct x Ct + L-NAME: 117,0  $\pm$  15,3 vs Cd x Cd + L-NAME: 59,7  $\pm$  11,05). Apocynin reduced reactivity in both groups, but with a greater magnitude in rings incubated with Cd (dAUC% Ct x Apo: 26,72  $\pm$  9,41 vs Cd x apo + Cd: 62,47  $\pm$  6,13). Catalase did not significantly alter the vascular response in the presence of Cd, the co-incubation and SOD SOD + Catalase reduced reactivity in rings incubated with Cd (Emax, Ct: 90,6  $\pm$  8,1; Cd : 113,6  $\pm$  6,4; SOD + Cd: 72,7  $\pm$  8,4; SOD+ Cd+ Cata 71,46  $\pm$  10,56). Losartan did not modify the response to phenylephrine compared to control values, but caused greater decrease in response in rings losartan + Cd compared to rings incubated with only Cd (Emax,Ct: 103,2  $\pm$  6,2; LOS+ Cd: 111,4  $\pm$  8,2). The same response was observed after incubation with enalapril. Indomethacin did not modify the response to phenylephrine compared to the control values, but caused greater decrease in response of rings Indo + Cd compared to rings incubated with only Cd (Emax,Ct: 88,4  $\pm$  3,6; Indo + Cd: 76,7  $\pm$  5,8). The same response was observed with the other inhibitors: NS 398 (Emax,Ct: 92,7  $\pm$  5,4; NS + Cd: 84,0  $\pm$  6,3), SQ 29,548 (Emax,Ct: 97,2  $\pm$  6,8; SQ + Cd 79,0  $\pm$  7,2), SC 19,220 (Emax,Ct 97,2  $\pm$  6,8; SC + Cd 102,9  $\pm$  7,6) furegrelato (Emax,Ct 86,6  $\pm$  6,1; FURE + Cd 70,8  $\pm$  7,3). The absence of endothelium (E-) caused an increase in response to FE compared to rings with intact endothelium (E+) in both groups. This increase was

smaller in magnitude in rings (E-) incubated with Cd when compared to E+ incubated with metal (% dAUC, CT;E+/E-  $147,95 \pm 21,9$  Cd; E+/E-  $67,63 \pm 19,04$ ). Cd did not alter the vasodilator response to ACh, or the response to NPS. Protein expression was similar in both control and cadmium treated groups.

Our results suggest that Cd increases Emax to FE acting on the vascular endothelium. Furthermore, the mechanisms responsible for this process appear to involve: increased bioavailability of angiotensin II and COX product; decreased release of NO induced by the increased production of free radicals.

Keywords: Aorta, ROS, COX-2, renin angiotensin system location.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Efeitos do cádmio sobre o processo angiogênico.	35
<b>Figura 2:</b> Sinopse do proposto mecanismo fisiológico e celular da hipertensão induzida por metais.	37
<b>Figura 3:</b> Estrutura e mecanismo catalítico da NOS	44
<b>Figura 4:</b> Esquema dos possíveis mecanismos de regulação da produção de óxido nítrico em células endoteliais	45
<b>Figura 5:</b> Fontes celulares de geração do estresse oxidativo	48
<b>Figura 6:</b> Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.	62
<b>Figura 7:</b> Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”. Sistema de aquisição de dados <i>Biopac Systems</i> .	63
<b>Figura 8:</b> Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.	65
<b>Figura 9:</b> A) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração resposta à fenilefrina; B) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração resposta à acetilcolina ou nitroprussiato de sódio.	66

- Figura 10:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (CT) e cádmio (Cd). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. **80**
- Figura 11:** Efeito da retirada mecânica do endotélio vascular sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. **81**
- Figura 12:** Curva concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao doador de óxido nítrico, NPS (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Cádmio pré-contraídas com fenilefrina.. **83**
- Figura 13:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). **85**
- Figura 14:** Liberação local de óxido nítrico (NO) na condição basal; estimulada e após a adição de triton com o uso de 5-diaminofluoresceína (DAF), em anéis de aorta de ratos controle (CT) e expostos ao cádmio (Cd). **86**
- Figura 15:** Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>), por meio da técnica de **87**

Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

**Figura 16:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina (APO, 0.3 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva da concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). **90**

**Figura 17:** Efeito do varredor do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio. Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. **91**

**Figura 18:** Efeito da catalase (Cata, 1000 U/ml), varredor do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Em (D) a co-incubação SOD mais catalase no grupo cádmio. **92**

**Figura 19:** Efeito do inibidor não específico da COX, indometacina (INDO, 10  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). **95**

**Figura 20:** Efeito do inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). **96**

**Figura 21:** Efeito do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). **96**

**Figura 22:** Efeito do antagonista do receptor EP<sub>1</sub>, SC 19,220 (10  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). **97**

**Figura 23:** Efeito inibidor da sintase do TXA<sub>2</sub>, furegrelato (10  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). **97**

**Figura 24:** Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0,1 mM) e do antagonista do receptor AT<sub>1</sub>, Losartan (10 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e cádmio. **100**

**Figura 25:** Resultados da expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT<sub>1</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmio (n = 7). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>1</sub> e da  $\alpha$ -actina. **102**

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Valores de $pD_2$ e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença ( $E^+$ ) e na ausência ( $E^-$ ) do endotélio, em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.	82
<b>Tabela 2:</b> Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100 $\mu M$ ) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.	85
<b>Tabela 3:</b> Efeito do inibidor da NADPH-oxidase, Apocinina (0.3 Mm) , do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e da Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre os valores de $pD_2$ e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.	93
<b>Tabela 4:</b> Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (10 $\mu M$ ), do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1 $\mu M$ ), do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 $\mu M$ ), do antagonista do receptor $EP_1$ , SC 19,220 (10 $\mu M$ ) e do inibidor da sintase do $TXA_2$ , furegrelato (10 $\mu M$ ), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.	98
<b>Tabela 5:</b> Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Enalapril (10 $\mu M$ ) e do antagonista do receptor AT1, Losartan (10 $\mu M$ ) sobre os valores de $pD_2$ e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Cádmio.	101



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

%- porcentagem

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – concentração intracelular de cálcio

[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> – Concentração intracelular de sódio

°C- graus Celsius

μM- micromolar

5-HT - 5- Hidroxitriptamina ou serotonina

AA-COX – ácido araquidônico- ciclooxigenase

AC – adenilato ciclase

ACh – acetilcolina

ADP – difosfato de adenosina

Akt – proteína quinase B

ANOVA- análise de variância

ATP- trifosfato de adenosina

CaCKII - cálcio calmodulina quinase

CAM- Ca<sup>2+</sup> - ATPase miosínica

CEUA/EMESCAM- Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

COX - ciclooxigenase

DAF - 4,5-diaminofluoresceína

DAG - diacilglicerol

DHE - diidroetídeo

EC<sub>50</sub> – resposta máxima ao fármaco

ECA – enzima conversora de angiotensina

eNOS – isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico

EPM- erro padrão da média

EROs – espécies reativas de oxigênio

ET-1 - endotelina

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FMN - flavina mononucleotídeo

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc - 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina

GPx – glutathione peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

Cd- Cádmio

CdCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cádmio

i.p.- Intra-peritoneal

iNOS - isoforma induzível da sintase do óxido nítrico

IP - receptor específico da PGI<sub>2</sub>

IP<sub>3</sub> – inositol trifosfato

L-NAME - L-NG-nitro-arginina metil éster-

M- Molar

mM- milimolar

n- número de unidades experimentais

NADPH oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato- oxidase

nM- nanomolar

nNOS - isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico

NO –óxido nítrico

NOS – sintase do óxido nítrico

NPS – nitroprussiato sódico

$O_2^{\bullet -}$  - ânion superóxido

$OH^{\bullet}$  - radical hidroxila

$OONO^{\bullet}$  - peroxinitrito

$PGD_2$  – prostaglandina D2

$PGE_2$  – prostaglandina E2

$PGF_{2\alpha}$  – prostaglandina F2  $\alpha$

$PGH_2$  – prostaglandina H2

$PGI_2$  - prostaciclina

PKA – Proteína cinase dependente de AMPc

PKC - Proteína cinase C

PKG- Proteína cinase dependente de GMPc

PLA2 - fosfolipase A2

PLC – fosfolipase C

ppm- Partículas por milhão

R<sub>máx</sub> – resposta máxima ao fármaco

-SH – Grupamentos sulfidrílicos

SNC – sistema nervosa central

SOD – superóxido dismutase

TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo

## **SUMÁRIO**

### **Páginas**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

### **I INTRODUÇÃO**

<b>1 Características do cádmio</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Contaminação Ambiental e Exposição</b>	<b>26</b>
<b>1.2 Efeito do cádmio nos diferentes sistemas</b>	<b>31</b>
<b>1.3 Efeito do Cádmio no Sistema Cardiovascular</b>	<b>33</b>
<b>1.4 Tônus vascular e sua regulação</b>	<b>38</b>
<b>1.5 Endotélio vascular</b>	<b>41</b>
<b>1.6 Óxido nítrico</b>	<b>42</b>
<b>1.7 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo</b>	<b>47</b>
<b>1.8 Via da Ciclooxigenase (COX)</b>	<b>52</b>
<b>1.9 Sistema Renina-Angiotensina</b>	<b>54</b>

### **II OBJETIVOS**

<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>59</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>59</b>

### **III MATERIAL E MÉTODOS**

<b>3.1 Animais experimentais</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Metodologia empregada para estudo de reatividade em anéis isolados de aorta de rato</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)</b>	<b>63</b>
<b>3.4 Avaliação da integridade funcional do endotélio</b>	<b>64</b>
<b>3.5 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina, à acetilcolina e ao</b>	<b>65</b>

nitroprussiato de sódio.	
3.6 Efeito do cádmio (10 µM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta	66
3.7 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e não-dependente do endotélio	66
3.7.1 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio	66
3.7.2 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio	67
3.8 Modulação do endotélio nas ações do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta	67
3.9 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta	68
3.10 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, com L-NAME, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	68
3.11 Análise da participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina	69
3.12 Análise da participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina	70
3.13 Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com cádmio	70
3.14 Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS), eNOS fosforilada e receptor AT1.	71
3.14.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas	71
3.14.2 Eletroforese e Transferência das Amostras	72
3.14.3 Incubação dos anticorpos	73
3.14.4 Detecção das proteínas	74
3.15 Expressão dos resultados e análises estatísticas	75
3.16 Fármacos e reagentes utilizados	76

#### **IV RESULTADOS**

4 Efeitos da exposição aguda ao cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos.	80
--	----

4.1 Participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina	81
4.2 Respostas vasculares a acetilcolina e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS)	83
4.3 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular a fenilefrina	84
4.4 Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com cádmio	86
4.5 Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e da eNOS fosforilada (p-eNOS <sup>ser1177</sup> )	87
4.6 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	88
4.7 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina	94
4.8 Análise da participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina	99
4.9 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT <sub>1</sub>	102
 V DISCUSSÃO	 104
 VI CONCLUSÕES	 123
 VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 125

# I INTRODUÇÃO

## 1 Características do cádmio

O cádmio é um metal de transição, na classificação periódica está localizado no grupo IIB, é branco prateado, maleável, dúctil, apresenta resistência química e mecânica. Os estados de oxidação do cádmio variam de acordo com os compostos, podendo ser +1, ou +2. O estado de oxidação +1 é muito raro, apresentando-se quase sempre no estado de oxidação +2 (Russel, 2004). Este metal foi descoberto no ano de 1817 pelo químico alemão Friedrich Stromeyer, quando do aquecimento da calamita (carbonato de zinco). Ao aquecer o minério em seu estado impuro ele observou uma coloração diferente durante o experimento, suspeitando se tratar de outro metal, até o momento desconhecido. O nome do elemento é proveniente do latim “*cadmia*” que significa calamita, em virtude do cádmio encontrar-se presente neste minério (Russel, 2004).

O cádmio não é encontrado na sua forma elementar na natureza, sendo encontrado combinado com outros elementos, tais como oxigênio, cloro, ou enxofre, é obtido industrialmente como subproduto da purificação eletrolítica do Cu, Pb e Zn ou por redução do CdS com Ca metálico (Mendham *et al.*, 2002).

O metal cádmio é utilizado principalmente como pigmentos para criar cores como amarelo, laranja, vermelhos e corantes marrons. Também é utilizado na composição tintas, plásticos e cerâmicas. Além disso, o metal é usado para produzir as baterias de níquel-cádmio e no processo de galvanização, como um anticorrosivo. Ele pode ser encontrado em condutores elétricos, no cloreto de polivinilo (PVC), em fotocélulas, pneus, radiadores de automóveis, componentes eletrônicos, e elementos de aquecimento.



O uso do cádmio na produção de pigmentos, estabilizantes de PVC e na galvanização tem sido reduzido e, em alguns países foi até extinto, no entanto, na União Europeia, tais fins ainda representam uma grande porção do consumo total de cádmio (NCM, 2003). A produção de baterias níquel-cádmio vem ganhando grande espaço no mercado mundial contribuindo para cerca de 78 % do consumo total do metal (NCM, 2003).

### ***1.1 Contaminação Ambiental e Exposição***

As fontes naturais de cádmio na atmosfera são a atividade vulcânica, a erosão de rochas sedimentares e fosfáticas e os incêndios florestais. O cádmio está presente em baixa abundância na maioria dos solos, rochas e águas, enquanto valores elevados, no entanto, estão associados com o chumbo e zinco e alguns minérios de rocha de fosfatos, que são uma rica fonte de fosfato para a produção de fertilizantes (Cercla, 1992; WHO, 1992).

O cádmio é encontrado em toda crosta terrestre na concentração de 0,1-0,5 ppm. É também um constituinte natural das águas dos oceanos com níveis médios entre <5 e 110 ng/L, geralmente concentra-se perto de áreas costeiras na forma de fosfatos marinhos (ATSDR, 2008). Em 1983, cerca de 140-1500 toneladas de cádmio foram lançadas para a atmosfera através de erupções vulcânicas (Nriagu, 1989). Para o mesmo ano, Nriagu e Pacyna (1988) estimaram a contaminação atmosférica por fontes antropogênicas em 7600 toneladas de cádmio.

As fontes antropogênicas incluem as atividades de mineração, produção, consumo e disposição de produtos que utilizam cádmio e as fontes consideradas “inadvertidas” onde o cádmio é constituinte natural do material que está sendo processado ou consumido: metais não-ferrosos, ligas de zinco, chumbo e cobre,

emissões de indústrias de ferro e aço, combustíveis fósseis (FIT, 2012). As concentrações relatadas de cádmio no sangue de trabalhadores expostos estão geralmente compreendidas entre 5 e 50 µg/L, mas exposições extremas tiveram como resultado os níveis de entre 100 e 300 µg/L (Roels *et al*, 1982; Hassler *et al*, 1983).

As fontes antropogênicas são as principais fontes de contaminação da população com cádmio, em especial, as indústrias são responsáveis pela contaminação da população de áreas ao seu entorno. Um exemplo clássico de contaminações por cádmio foi bastante divulgado: em 1910 no período pós-guerra, o acidente ocorrido nas margens do rio Jintsu, na região de FunchuMachi, no Japão, quando plantadores de arroz e pescadores se viram acometidos de dores reumáticas e mialgias. Esses trabalhadores foram vítimas dos despejos industriais de jazida de zinco e chumbo denominada de Kamioka e da respectiva usina de processamento de chumbo e zinco, localizadas a 50 km das margens do rio. A doença, causada pelo cádmio, elemento contaminante natural deste processamento, ficou conhecida na ciência médica como Itai-Itai.

Adquiriu este nome porque as vítimas gemiam muito e itai-itai significa o gemido da dor "aiai". É caracterizada por dores súbitas na área lombar, nas costas e nas articulações. Mesmo com protestos da população contra a contaminação dos arrozais, para atender a demanda da indústria bélica, ocorreu aumento da produção de chumbo e zinco. Isso elevou a concentração de cádmio nos efluentes do referido rio, o que resultou no agravamento da contaminação da população (Friberg *et al*., 1974).

No Brasil, em 1996, no Rio de Janeiro, em Itaguaí, uma fábrica de zinco eletrolítico foi denunciada por despejar na região mais de 50 milhões de litros de

água e lama contendo zinco e cádmio, contaminando os manguezais que abrigavam caranguejos, siris, ostras e mexilhões, consumidos pelas populações locais e da cidade do Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 1996).

Devido às suas propriedades não biodegradáveis, cádmio persiste no ambiente e bioacumula em plantas e animais incluindo o ser humano (Satarug, *et al.*, 2003; Clemens, 2006). Certas plantas (por exemplo, tabaco, amendoim, sementes de girassol, sementes de linhaça) e animais (por exemplo, filtradores como ostras) podem bioacumular altos níveis de cádmio e são referidos como hiper-acumuladores (Kruzynski, 2004; Whyte *et al.*, 2009; Bendell, 2010). O conteúdo de cádmio de ostras do oceano Pacífico chega a 13,5 mg/kg de peso seco, enquanto que, a quantidade de cádmio observada nas ostras da costa da Nova Zelândia, é duas vezes maior, devido à contaminação dessa área (Copes *et al.*, 2008).

A alimentação e o tabagismo são as principais fontes de exposição para a maioria das pessoas, alta carga corporal de cádmio foi associada com o consumo frequente de moluscos e crustáceos (Haswell-Elkins *et al.*, 2007; Copes *et al.*, 2008; Satarug, 2010) e ao tabagismo (El-Agha & Gökmen 2002, Marano *et al.*, 2012). A maior fonte de captação de cádmio por humanos é portanto, o tabagismo (um cigarro contém aproximadamente 1 a 2 µg; diariamente há captação de aproximadamente 1 a 3 µg por maço de cigarro fumado) e para não fumantes a alimentação é a maior fonte (ingestão diária, aproximadamente 30 µg, captação de cerca de 1 a 3 µg) (ATSDR, 2008).

O acúmulo substancial em vegetais folhosos, sementes oleosas e folhas de tabaco é devido ao uso de fertilizantes fosfatados que possuem o metal em sua constituição (WHO, 1992). Fumantes apresentam aproximadamente o triplo da concentração sanguínea de cádmio encontrada na população não-fumante (1.58

$\mu\text{g.L}^{-1}$  para fumantes vs  $0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$  para não-fumantes), o que faz do fumo do tabaco, a principal forma de exposição não-ocupacional ao cádmio (ATSDR, 2008). O alto nível de cádmio em fumantes tem sido associado ao aumento do risco de hipertensão e doenças cardiovasculares (Afridi *et al.*, 2010).

Abu-Hayyeh *et al.*, (2001) interessantemente, demonstraram que o teor de cádmio em aortas de humanos aumenta em proporção direta para os anos/maço de cigarros fumados, com o acúmulo seletivo na camada média. A concentração média de cádmio na camada média de aorta de humanos foi de  $7 \mu\text{mol/L}$ . Essa concentração de cádmio foi suficiente para reduzir significativamente a síntese de colágeno nessas células.

Outra forma de exposição crescente, em especial para crianças, é através de pigmentos coloridos que contém esse metal. A concentração de cádmio tem sido uma das principais causas de “recall” em diferentes produtos infanto-juvenis como joias, brinquedos, tintas, e outros itens comuns. Em 2010, empresas voltadas para o mercado pré-adolescente, incluindo Claire’s Stores, Wal-Mart e Dress Barn, fizeram “recall” de produtos como colares, brincos e pulseiras depois de descobrirem que os produtos continham níveis substanciais de cádmio. No mesmo ano, a empresa McDonald’s realizou “recall” de 12 milhões de copos do “Shrek” pelo mesmo motivo (Mead, 2010). O cádmio foi utilizado nesses produtos para produzirem cores como vermelho e amarelos intensos.

A Organização Mundial de Saúde adota como limite de segurança para a ingestão de cádmio de  $7 \mu\text{g/semana/kg}$  de peso corporal. Esse valor foi baseado na concentração renal crítica de cádmio de 100 a  $200 \mu\text{g/g}$  de peso seco, o que corresponde à concentração urinária de cádmio de 5 a  $10 \mu\text{g/g}$  de creatinina (WHO, 1993). Os principais marcadores de exposição ao cádmio são as concentrações de

cádmio na urina e no sangue total. A concentração de cádmio na urina de 24 horas é utilizada como marcador para a exposição de longo prazo (Nordberg *et al.*, 2007). Já a concentração sanguínea de cádmio reflete exposição mais recente, decorrentes dos últimos meses (Nordberg *et al.*, 2007) e tem como limite de tolerância biológica o valor de 5 µg/L de cádmio no sangue (ACGIH, 2007).

O cádmio pode se tornar disponível para distribuição por diferentes vias entre elas: oral, inalatória e cutânea. No entanto, em torno de 50% do cádmio inalado é absorvido, enquanto que a via oral permite a absorção de apenas 5% da dose do metal (WHO, 1992). Ao se tornar disponível ao organismo o mesmo apresenta amplo volume de distribuição podendo influenciar diferentes órgãos e sistemas. O cádmio não apresenta função endógena conhecida. O cádmio se acumula em diversos órgãos, principalmente nos rins e no fígado, apresentando meia-vida em torno de 10 à 35 anos em humanos (WHO, 1992). Sua excreção renal diária é de apenas 0.007% do conteúdo corporal de cádmio, apresentando grandes variações entre indivíduos (WHO, 1992).

Após absorvido, o cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), ganha a circulação onde pode circular como íon livre ou se ligar a proteínas plasmáticas como albumina e à metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular, rica em cisteína, com grande afinidade por metais (Bressler *et al.*, 2004; Nordberg, 2004). A partir daí o Cd é absorvido pelas células dos órgãos alvo (fígado, rins e testículos) através de transportadores de soluto e de canais de cálcio, manganês, ferro (Bressler *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2005; Levesque *et al.*, 2008).

A ligação a MT impede as ações do cádmio sobre outras macromoléculas além de dificultar a excreção renal desse metal (Klaassen *et al.*, 2009). Assim, quando o complexo MT- $\text{Cd}^{2+}$  chega aos rins, é filtrado e reabsorvido pelas células

dos túbulos proximais, onde a ligação desse complexo é quebrada, liberando o cádmio bivalente para a circulação. Quando o conteúdo de cádmio excede a capacidade de produção e ligação dessa proteína, a concentração de cádmio livre aumenta e passa a causar seus efeitos deletérios sobre diversos tecidos (Friberg *et al.*, 1986).

### **1.2 Efeito do cádmio nos diferentes sistemas**

O cádmio altera de maneira prejudicial diferentes órgãos e sistemas causando diversas desordens. Dependendo da dose, via e duração da exposição, Cd pode danificar vários órgãos, incluindo os rins, pulmões, fígado e testículos (Elinder and Kjellstrom, 1986; Jarup *et al.*, 1998). Além disso, o cádmio possui atividade teratogênica e carcinogênica (Degraeve, 1981; IARC, 1993). Evidências, sugerem que muitos dos efeitos do Cd no organismo envolvem ações sobre o endotélio vascular (Navas-Acien *et al.*, 2004 e 2005, Woods, 2007; Prozialeck, 2008).

A exposição crônica a altas concentrações de cádmio é caracterizada por prejuízo da função tubular e glomerular, além de osteomalácia e osteoporose, que resulta em dor intensa e fraturas múltiplas de ossos (Inaba *et al.*, 2005). Já a exposições a baixas doses tem sido relacionado ao prejuízo da função tubular renal com perda da capacidade reabsortiva de nutrientes, vitaminas e minerais. Esses efeitos acabam influenciando no funcionamento de outros órgãos, a exemplo dos ossos que, com a redução do cálcio sanguíneo, sofre desmineralização (WHO, 1992).

Evidências sugerem que a exposição crônica a baixas doses de cádmio prejudica a função das células  $\beta$  pancreáticas, produtoras de insulina, e, portanto pode estar associada ao diabetes tipo 2 (Muayed *et al.*, 2012). De um ponto de vista

biológico, Cd e em menor grau o mercúrio (Hg) é de interesse na biologia das células  $\beta$  pancreática, secretoras de insulina, dada a sua semelhança com zinco (Zn) e a importância de Zn na fisiologia dessas células (Dodson & Steiner, 1998; Chimienti *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2009). As células  $\beta$  têm altas concentrações intracelulares de Zn, particularmente no interior de vesículas secretoras, onde o zinco facilita a formação hexâmeros de insulina, além disso, o Zn pode desempenhar um papel na transformação de pró-insulina em insulina para secreção (Huang *et al.*, 1995; Lemaire *et al.*, 2009). Cd e Hg são metais divalentes e membros do mesmo grupo do Zn na tabela periódica e, por conseguinte, apresentam características químicas semelhantes. Em vários tipos de células,  $\text{Cd}^{2+}$  e, em menor grau,  $\text{Hg}^{2+}$  competem com  $\text{Zn}^{2+}$  em várias proteínas de ligação e transportadores (Eddins *et al.*, 2008; Antala *et al.*, 2012). A análise dos participantes da “*Third National Health and Nutrition Examination Survey*” (NHANES III) demonstrou uma associação significativa entre níveis elevados de cádmio urinário e o aumento nos níveis de glicemia em jejum (110-126 mg/dL) (Schwartz *et al.*, 2003).

Outro efeito tóxico da exposição ao cádmio é a associação com o desenvolvimento de câncer em diferentes órgãos e tecidos (Riederer *et al.*, 2013). A “*International Agency for the Research on Cancer*” considera esse metal como carcinogênico (IARC, 1993). Entre as causas, relaciona-se o aumento do estresse oxidativo (Cuypers *et al.*, 2010), atividade modificada de fatores de transcrição (Watkin *et al.* 2003), e inibição de reparação do DNA (Jin *et al.*, 2003). Esses fatores levam ao aumento da mutagênese e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de câncer.

### **1.3 Efeito do Cádmio no Sistema Cardiovascular**

Apesar da ideia dos metais pesados (em especial, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio) serem considerados fatores de riscos para a saúde estar amplamente difundida, os mecanismos específicos pelos quais os metais produzem os seus efeitos adversos ainda não estão completamente esclarecidos. No entanto, há evidências que indicam que muitos dos efeitos desses metais, entre eles o cádmio, podem resultar de ações específicas de vários componentes do sistema vascular.

O funcionamento do sistema vascular envolve interações complexas entre o endotélio vascular, o músculo liso vascular, o sistema imunitário, o sistema nervoso, e até mesmo fatores químico/metabólicos locais em órgãos e tecidos (Gibbins *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003; Villar *et al.*, 2006). Estes efeitos vasculares contribuem para uma variedade de condições patológicas, incluindo, aterosclerose e hipertensão (Navas-Acien *et al.*, 2005b; Prozialeck *et al.*, 2006). Epidemiologicamente, há uma associação entre altos níveis de cádmio com: hipertensão, acidente vascular cerebral e parada cardíaca (Navas-Acien *et al.*, 2005, Bhatnagar 2006, Tellez-Plaza *et al.*, 2008).

A hipótese de que o endotélio vascular é um importante alvo na toxicidade ao cádmio foi primeiramente relatada ainda no século XX quando Alsberg & Schwartz (1919) demonstraram que a exposição aguda ao Cd administrada por via subcutânea em ratos, provocou coloração arroxeadada nos testículos desses animais. Na década de 1950 e 1960, outros pesquisadores relataram que Cd causou hemorragia dos testículos em uma ampla variedade de espécies (Parizek & Zahor, 1956; Kar & Das, 1960; Chiquoine, 1964; Hoey, 1966). Estudos posteriores atribuíram esse efeito vascular do cádmio à ruptura das junções entre as células endoteliais de capilares e vênulas testiculares, resultando em aumento da



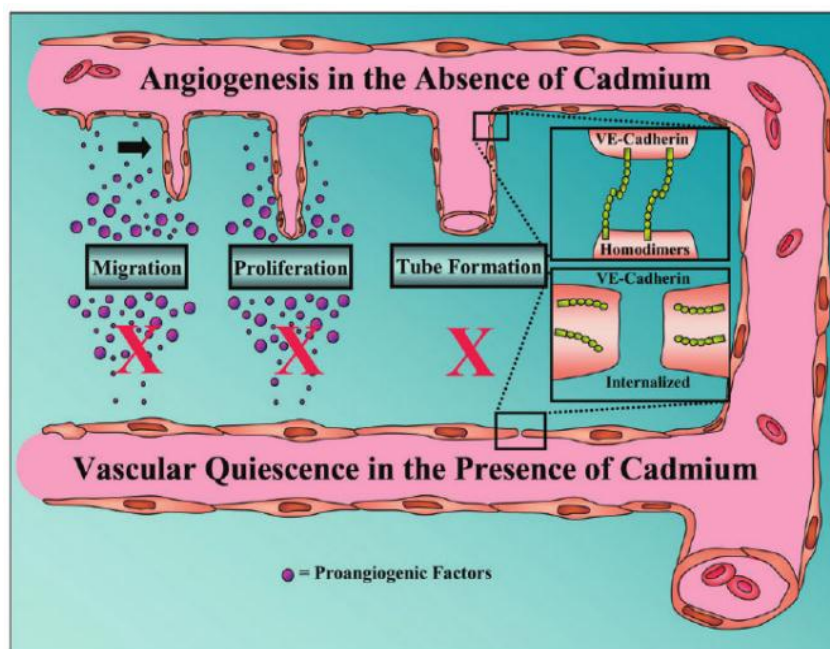
permeabilidade testicular, seguido de edema, hemorragia e necrose (Gunn & Gould, 1970; Gabbiani et al., 1974; Fende e Niewenhuis, 1977; Aoki & Hoffer, 1978; Sacerdote & Cavicchia, 1983).

Experimentos “*in vitro*” em células endoteliais, utilizando baixa concentração de cádmio, induzem morte celular e levam ao aumento da permeabilidade dessas células (Messner et al., 2009). Além disso, Cd induz a expressão de várias moléculas de adesão pró-aterogênica à superfície de células endoteliais, tais como molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e adesão da célula vascular (VCAM-1) facilitando a adesão e migração de células do sistema imunológico para a parede do vaso (Szuster-Ciesielska et al., 2000).

Entre os efeitos vasculares, atualmente tem-se pensado se esses metais possuem efeitos sobre a angiogênese. Relativamente pouco tem sido publicado sobre os efeitos dos metais nesse aspecto. No entanto, há um volume crescente de evidências indicando que certos metais tóxicos, principalmente cádmio e o arsênio, podem ter efeitos profundos sobre a angiogênese, Prozialeck et al., (2008) publicou uma revisão em que destaca os possíveis efeitos do cádmio no processo angiogênico, como pode ser demonstrado na figura 1.

Somado a isso, Kolluro et al., (2006) mostraram que o cádmio pode inibir diretamente a migração de células endoteliais e formação do tubo, associando esses efeitos com produção reduzida de NO pelas células endoteliais.

## Os efeitos do cádmio sobre o processo angiogênico.



**Figura 1:** Os efeitos do Cd sobre o processo angiogênico. O processo angiogênico pode ser dividido em várias etapas sequenciais, as quais podem ser examinadas *"in vitro"*, incluindo a migração de células endoteliais, proliferação e formação do tubo. A parte superior da figura demonstra o processo angiogênico normal que ocorrem na ausência de cádmio. As células endoteliais migram em resposta a uma atração química, proliferam enquanto se estende do vaso sanguíneo existente e, em última análise, diferenciam-se em estruturas semelhantes a tubos. Este último processo é conhecido por envolver VE-caderina, que está envolvida na adesão célula-célula, assim como a formação intercelular do lúmen (Yang *et al.*, 1999). Na parte inferior, na presença de Cd, há evidências sugerindo que a quiescência vascular predomina na presença de Cd. Estudos (Kishimoto *et al.*, 1996a) sugerem que o Cd inibe a migração de células endoteliais, proliferação, e o processo de formação do tubo.

(modificado de: Prozialeck *et al.*, 2008)

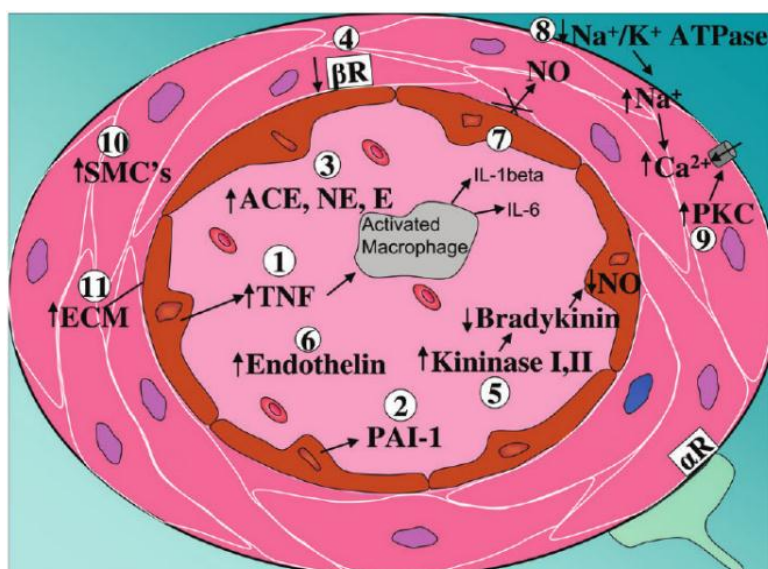
A exposição ao cádmio também foi associada à aterosclerose em modelos animais de exposição. Knoflach e colaboradores (2011) estudaram histologicamente a aorta de camundongos Apo-E *knockout* expostos ao cádmio por doze semanas. Os resultados indicaram que o cádmio afeta a integridade das camadas de células endoteliais facilitando o influxo de componentes séricos pró-aterogênicos e o recrutamento de leucócitos.

Outro aspecto a ser considerado, não de maneira independente, mas possivelmente como consequência do dano vascular, é a relação existente entre níveis de cádmio e hipertensão, vários estudos epidemiológicos sugerem essa

associação (Vivoli *et al.*, 1989; Luoma *et al.*, 1995; Satarug *et al.*, 2003, 2005;). Em estudo clínico, Houtman (1993) observou que pacientes com hipertensão apresentavam maiores concentrações de cádmio na urina e, além disso, em áreas contaminadas com o cádmio, havia maior incidência de aterosclerose.

Prozialeck *et al.*, (2008) destaca alguns dos mecanismos relatados pelos quais os metais, como o Cd e Pb, podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão. No caso de Cd, provas consideráveis sugerem que os efeitos hipertensos resultam das ações complexas sobre o endotélio vascular e do músculo liso vascular. Esse mecanismo é proposto na figura 2:

***Sinopse do proposto mecanismo fisiológico e celular da hipertensão induzida por metais.***



**Figura 2:** Sinopse do proposto mecanismo fisiológico e celular da hipertensão induzida por metais. No gráfico, os números de 1-7 descrevem os mediadores

vasoativos/receptores endócrino ou parácrinos. Já os números 8-11 refletem mudanças diretas na fisiologia do músculo liso vascular e do tecido conjuntivo associado a exposição metal. Abreviaturas:  $\alpha$ R = receptor  $\alpha$ -adrenergico; ACE = enzima conversora da angiotensina;  $\beta$ R = receptor  $\beta$ -adrenergico, E = epinefrina; ECM = matriz extracelular; IL = interleucina, NE = norepinefrina; NO = óxido nítrico; PAI-1 = ativador do plasminogênio-1; PKC = proteína quinase C; SMC's = células musculares lisas; TNF = fator de necrose tumoral  $\alpha$ .

(modificado de: Prozialeck et al, 2008)

Atualmente, acredita-se que a disfunção endotelial contribui para manutenção do aumento de resistência vascular, favorecendo o processo hipertensivo (Cannon III, 1998; Kolluru et al., 2010; Triggle et al., 2003).

Apesar da associação entre exposição ao cádmio e hipertensão não ser completamente esclarecida em humanos, a indução da hipertensão pela exposição ao cádmio é observada em diversos modelos animais. Há relatos da indução de dano no túbulo renal proximal, retenção de sal e aumento do volume sanguíneo como possível causa da hipertensão induzida pelo cádmio (Satarug et al., 2005). Outros autores associam à depleção da glutathiona (Valko et al., 2005) levando ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica, como possíveis ações pró-hipertensivas induzidas pelo cádmio (Yiin et al., 1999). Hipóteses adicionais para o mecanismo de desenvolvimento de hipertensão após a exposição ao cádmio incluem interação com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Balaraman et al., 1989), estimulação do sistema nervoso simpático (Fadloun & Leach, 1980), e redução da liberação de agentes vasodilatadores (Skozynska & Martynowicz, 2005). Além disso, o endotélio vascular é considerado o principal alvo, do sistema cardiovascular, de intoxicação pelo cádmio, levando ao desequilíbrio da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras levando ao aumento do tônus vascular (Martinowics et al., 2004; Kolluru et al., 2006; Donpunha et al., 2011).

Conforme descrito, observa-se que os efeitos do cádmio sobre o sistema cardiovascular, em especial sobre o endotélio vascular, tanto em humanos quanto em ratos, resultam em alterações envolvendo diversos mecanismos que cursam com disfunção endotelial e aumento da pressão sanguínea. Nesse sentido, para que se possa ter uma melhor compreensão dos efeitos do cádmio sobre o leito investigado, bem como um melhor entendimento das vias funcionais e bioquímicas que foram estudadas no presente estudo faremos uma breve descrição sobre as principais vias endoteliais que podem estar envolvidas nas respostas vasculares provocadas por esse metal.

#### ***1.4 Tônus vascular e sua regulação***

O principal fator determinante da resistência vascular periférica é o tônus vascular. Assim como, a resistência vascular periférica é importante na regulação da pressão sanguínea e na distribuição do fluxo sanguíneo entre e dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células do músculo liso vascular (MLV) é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores oriundos de hormônios, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão sanguínea (Jackson, 2000; Blaustein & Hamlyn, 2010).

As células do MLV, assim como as demais células musculares, dependem diretamente de um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para deflagrar sua contração. Essa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é regulada por vários sistemas de entrada, saída e estoque de cálcio. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre por diversos canais entre eles: canais para cálcio operados por receptores (ROCs); canais para cálcio operados por voltagem (VOCs); canais para cálcio operados por estoques (SOC) e canais para

cálcio ativados por estiramento (SAC). Pode-se citar também a entrada ou saída de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que é regulado pelo gradiente eletroquímico de sódio. Tal gradiente, por sua vez, é controlado pela  $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPase}$ . Além dos canais que promovem influxo ou efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , esse íon também é armazenado pelo retículo sarcoplasmático (RS) através do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela bomba de cálcio do retículo (Kim *et al.*, 2008, Blaustein & Hamlyn, 2010).

Sendo assim, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais da membrana plasmática e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares são a maior fonte para ativação da contração. Essa contração é mediada por dois mecanismos: acoplamento eletromecânico e acoplamento farmacomecânico (Somlyo & Somlyo, 1968).

O acoplamento eletromecânico baseia-se na contração dependente das mudanças no potencial de membrana da célula. A despolarização da membrana, induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de  $\text{K}^+$  extracelular, promove influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da abertura de canais VOCs, causando contração (Bulbring & Tomita, 1987; Ganitkevich & Isenberg, 1991). Ainda, trabalhos mostram que o KCl, atua como um estímulo sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (Ratz *et al.*, 2005). Entretanto, o acoplamento farmacomecânico baseia-se na contração induzida por agonistas contráteis, como norepinefrina, endotelina, angiotensina II, serotonina e fenilefrina. Esses agonistas ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G. A interação agonista-receptor ativa a subunidade  $\alpha$  da proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $\text{IP}_3$  interage com seus receptores na membrana do RS e estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais da membrana, além de aumentar a

sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e fosforilar a cadeia leve da miosina. Todos esses mecanismos aumentam a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Laporte *et al.*, 2004; Blaustein & Hamlyn, 2010).

Dessa forma, o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Uma vez formado o complexo cálcio-calmodulina, ocorre ativação da MLCK que, por conseguinte, ativa a fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$ , viabilizando a interação entre os miofilamentos de actina e miosina, portanto, a contração muscular (Stull, *et al.*, 1991; Horowitz, *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008). Contudo, quando a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é menor que  $10^{-6}$  M, ocorre desativação do complexo cálcio-calmodulina-MLCK. Entra em ação, a enzima fosfatase de cadeia leve, removendo o grupo fosfato da miosina, ou seja, desfosforilando a miosina. Assim, a baixa atividade da ATPase torna a contração inibida, e consequentemente induz o relaxamento do músculo liso vascular.

Assim, hormônios e neurotransmissores possuem capacidade regulatória sobre a atividade contrátil das células do MLV, e, portanto, sobre o tônus vascular, fator determinante da resistência vascular periférica. Adicionalmente, fatores derivados do endotélio vascular também atuam na regulação do tônus vascular.

### **1.5 Endotélio vascular**

O endotélio vascular é formado por uma camada de células localizada na interface entre o sangue e o músculo liso vascular. Encontra-se localizado estrategicamente na parede vascular e assim ele pode: atuar como sensor de alterações hemodinâmicas; transmitir sinais celulares e da matriz extracelular; produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte celular; manter as alterações adaptativas para a adequação às necessidades

circulatórias (Carvalho *et al.*, 2001). Além disso, as células endoteliais realizam importantes eventos fisiológicos e fisiopatológicos, respondendo à forças mecânicas e a agentes neuro-humorais, e são responsáveis pela liberação de fatores contráteis e relaxantes (Vanhoutte, 2009).

O endotélio é capaz de liberar substâncias metabolicamente ativas, as quais modulam importantes funções no organismo tais como o controle do tônus vasomotor, o calibre vascular, o fluxo sanguíneo e também participam do controle das respostas inflamatórias e imunológicas (Rubanyi, 1993). Essas substâncias produzidas pelo endotélio foram nomeadas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (Furchgott & Vanhoutte, 1989).

Dentre as substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio podemos citar, o óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadski, 1980) a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Bunting *et al.*, 1976; Moncada *et al.*, 1977; Vanhoutte, 1993) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Taylor & Weston, 1988; Félétou & Vanhoutte, 1988). Quanto às substâncias vasoconstritoras temos a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), os ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Furchgott, 1983; Rubanyi & Vanhoutte, 1986) e os produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e as prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> (PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>) (Frolish & Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993).

## **1.6 Óxido nítrico**

Em 1980 Furchgott & Zawadski, foram os primeiros a demonstrar o papel determinante das células endoteliais intactas, na vasodilatação induzida pela



acetilcolina em anéis de aortas e arteríolas de coelhos. . A partir desse estudo, esses autores sugeriram que o endotélio liberava um fator difusível essencial para o relaxamento vascular, o qual eles denominaram de EDRF, porém, ainda era preciso identificar qual seria esse fator. Então, a partir dessa descoberta surgiram vários estudos a fim de identificar qual seria essa importante substância vasodilatadora derivada do endotélio.

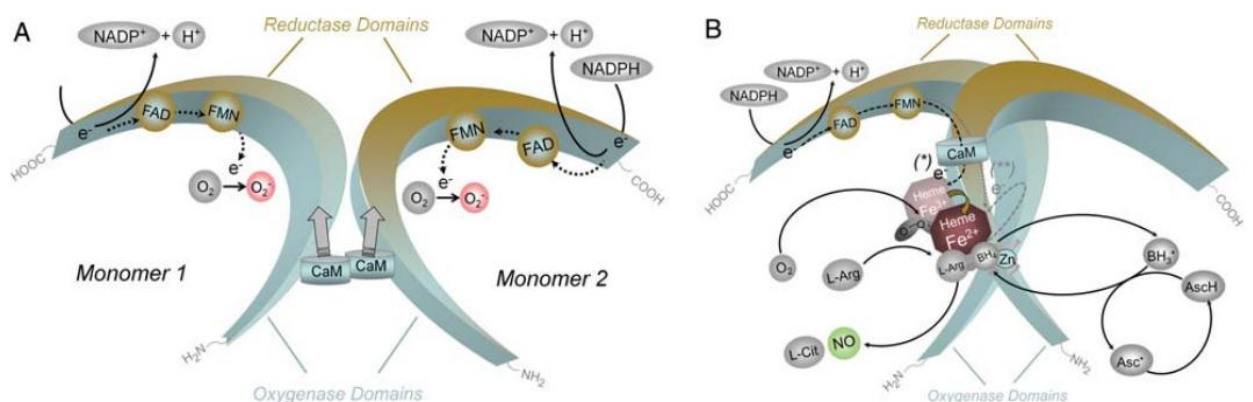
Inicialmente se achava que o EDRF era um fator derivado da via do ácido araquidônico ou que era uma substância lábil produzida pelas reações redutoras em pH fisiológico (Furchgot, 1984; Marín, & Sanchez-Ferrer, 1990). Posteriormente, a partir dos estudos realizados em 1987, por três grupos de pesquisadores absolutamente independentes, descobriu-se que o EDRF era o NO (Furchgott, *et al.*, 1987; Ignaro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987).

O NO é um gás que possui solubilidade reduzida em água, concentração, cerca de 1,9 mmol/L em solução saturada, meia vida curta e alta permeabilidade em membranas celulares (Kerwin *et al.*, 1995).

O NO é sintetizado por ação da sintase do óxido nítrico (NOS) pela conversão de L-arginina a L-citrulina e NO, necessitando de oxigênio, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH<sub>4</sub> (tetrahidrobiopterina) (Förstermann & Sessa 2012) como pode ser demonstrado na figura 3. Existem três isoformas da sintase do NO: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (eNOS) ou em células neuronais (nNOS), e que tem sua ativação dependente do complexo cálcio-calmodulina; e outra que não está presente constitutivamente mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, que levam ao aumento de cálcio intracelular e ativação da

expressão em macrófagos, células endoteliais, cardiomiócitos, dentre outros tipos celulares (Förstermann *et al.*, 1994).

### Estrutura e mecanismo catalítico da NOS



**Figura 3:** Em A: Representação dos monômeros da NOS com capacidade de redução de NADPH a FAD e FMN através da transferência de elétrons também capacidade limitada para redução de oxigênio molecular a ânion superóxido. Em B: Na presença do grupo Heme e demais substrato e cofatores ocorre o acoplamento funcional dos monômeros da NOS, formando dímero e permitindo a transferência sequencial de elétrons e consequente formação de NO via NOS.

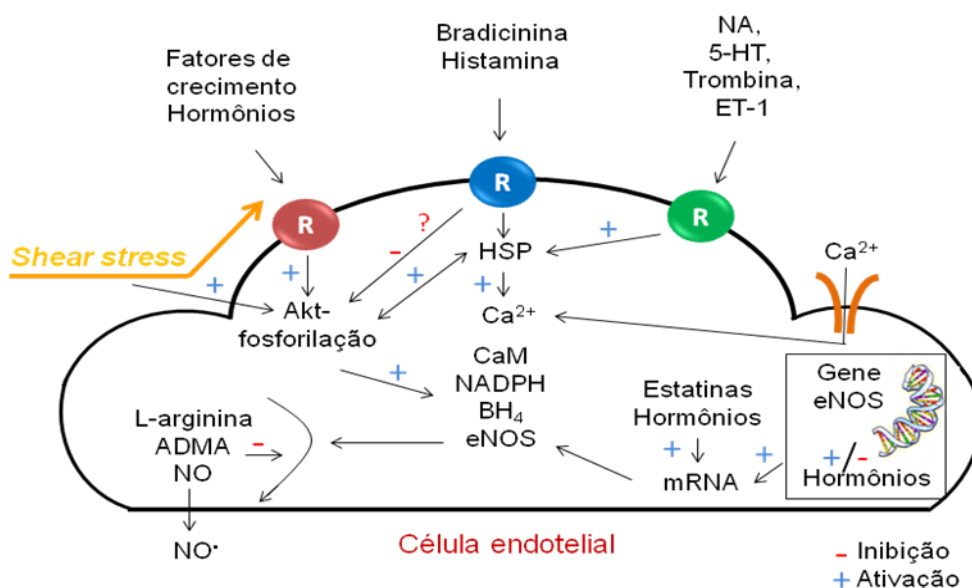
(Modificado de Förstermann & Sessa 2012)

A síntese de NO é induzida por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento, agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), serotonina (5-HT), acetilcolina

(ACh) entre outras (Moncada *et al.*, 1994; Marín & Rodriguez-Matinez, 1995) como pode ser demonstrado na Figura 4.

Para produzir relaxamento vascular o NO se difunde para o músculo liso vascular e por ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e assim o relaxamento vascular. Além disso, a PKG via canais para K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>2+</sup> e voltagem hiperpolarizam a membrana plasmática promovendo relaxamento. Dentre todas as ações da PKG que também promovem relaxamento vascular podemos ressaltar a fosforilação do fosfolambam (PLB) que deixa de inibir a Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando a recaptação de cálcio e a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK) diminuindo sua sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> (Lincoln *et al.*, 2001; Marín & Rodriuez-Martinez, 1995).

***Esquema dos possíveis mecanismos de regulação da produção de óxido nítrico em células endoteliais***



**Figura 4:** O NO é produzido pela conversão de L-arginina pela sintase endotelial do NO (eNOS). A transcrição da enzima é regulada genomicamente por hormônios e fatores de crescimento. A atividade normal da eNOS requer cálcio, calmodulina, NADPH e 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). A ativação de outros receptores modulam a produção de NO através das *heat shock protein* (HSP) ou fosforilação da Akt. O ADMA, metabólito da L-arginina, reduz a produção de NO por se ligar competitivamente a eNOS.

(Modificado de Vanhoute, 2009).

Os efeitos mediados pelo NO dependem da expressão da NOS, da biodisponibilidade de fatores que regulam a atividade da NOS e das espécies reativas do oxigênio (Chatterjee & Catravas, 2008).

A redução na produção ou na biodisponibilidade de NO pode ser um dos mecanismos que contribui para o aumento da resistência vascular periférica e o desenvolvimento da hipertensão em diferentes modelos experimentais e também em humanos (McIntyre *et al.*, 1999).

Para que a função endotelial mantenha-se normal é essencial que haja um equilíbrio entre os níveis de ânion superóxido e a liberação de NO (Fraga *et al.*, 1990; Nakae *et al.*, 1997). No entanto, a interação entre NO e o ânion superóxido é o principal mecanismo de redução de biodisponibilidade dessa molécula, visto que quando os níveis de ânion superóxido estão elevados ocorre competição do NO com a superóxido dismutase (SOD) pelo ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e como a reação do NO com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é aproximadamente seis vezes mais rápida que a reação deste com a SOD, o NO torna-se um “scavenger” de ânion superóxido muito mais potente que a SOD e isto leva a redução da biodisponibilidade do NO e a geração do peróxido nitrito (ONOO<sup>-</sup>) que é um potente agente oxidante (Rubany & Vanhoute, 1986; Koppenol *et al.*, 1992; Beckman & Koppenol, 1996).

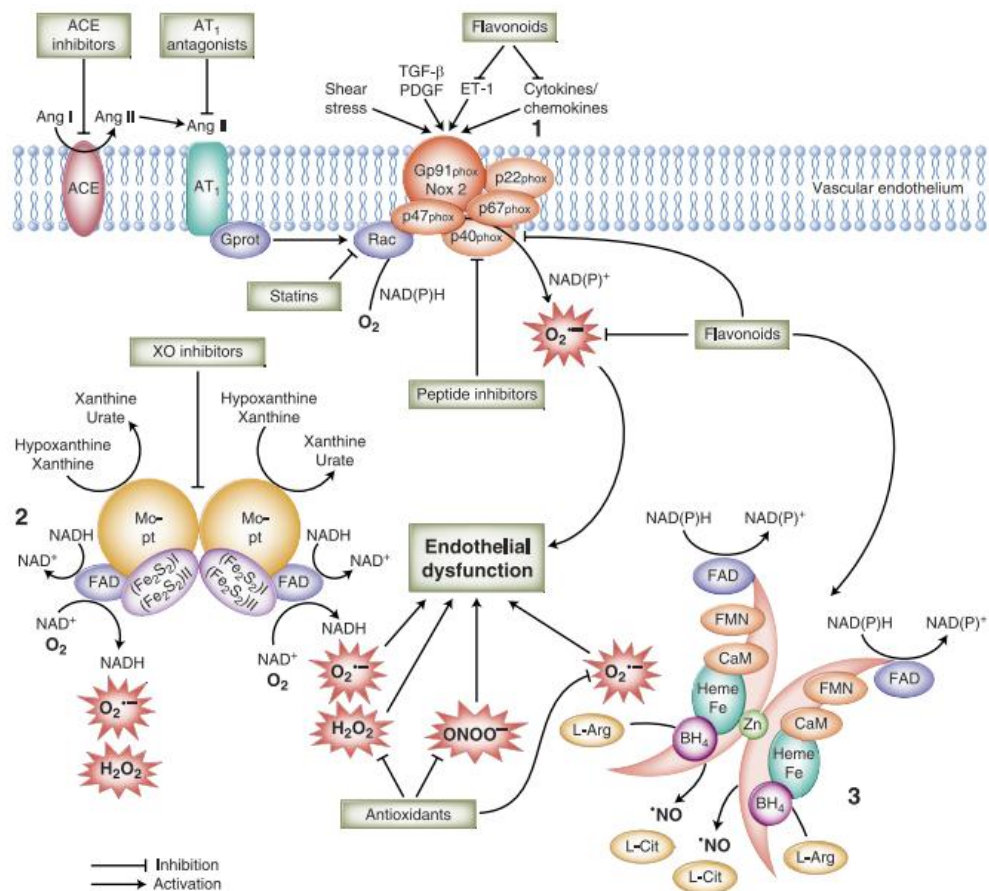
O aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> associado à redução da capacidade anti-oxidante e a disfunção endotelial também é observado em condições de

hiperglicemia e Diabetes. Resultados semelhantes têm sido observados em estudos *in vitro* e *in vivo* com diferentes modelos experimentais onde a exposição ao cádmio promove aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial, disfunção esta possivelmente promovida pela redução da biodisponibilidade do NO devido à ação das espécies reativas do oxigênio (Siow *et al.*, 1995; Sompamit *et al.*, 2010; Donpunha *et al.*, 2011). Somado a isso, Martynowics e colaboradores (2004) demonstraram reduzida biodisponibilidade NO em aorta de ratos expostos ao metal após quantificação no soro e na aorta de agentes vasoativos.

### **1.7 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo**

O termo radical livre pode ser definido como átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita (Beckman *et al.*, 1990; Halliwell, 1997; Bergendi *et al.*, 1999). Como fontes celulares geradora de radicais livres pode-se citar: a mitocôndria como a principal geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições fisiológicas e patológicas (Lee & Wei, 2007), a xantina oxidase, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS e as enzimas da família das NADPH oxidases (Mueller *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh *et al.*, 2009). Weseler & Bast (2010), por meio de uma revisão bibliográfica, propuseram as fontes celulares de geração do estresse oxidativo, conforme demonstra a figura 5.

## Fontes celulares de geração do estresse oxidativo



**Figura 5:** Fontes celulares de geração do estresse oxidativo vascular e algumas estratégias de intervenções farmacológicas. (1) NADPH- oxidase (2) xantina oxidase (3) óxido nítrico sintase desacoplada. Juntas promovem a produção de espécies reativas de oxigênio.

*(Modificado de Weseler & Bast, 2010)*

As células vasculares produzem EROs em condições normais, estas espécies, são encontradas em baixos níveis no interior da célula e são

constantemente geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário para que estas espécies modulam a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo ou por ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (Szasz, 2007; Weseler & Bast, 2010; Zinkevich & Gutterman, 2011)

No sistema vascular o  $O_2^{\bullet-}$ , é o ERO mais importante, sendo formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases e também a partir da NOS desacoplada (Weseler & Bast, 2010; Förstermann & Sessa 2012). Após ser formado o ânion superóxido além de exercer seus efeitos em diferentes vasos e órgãos pode dar origem a outras EROs. O  $O_2^{\bullet-}$  reage com o NO, inativa-o e dá origem ao peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ) e por ação da SOD o  $O_2^{\bullet-}$  é dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e este pode ser convertido em água por ação da glutathione peroxidase (GPx) ou da catalase. O  $H_2O_2$  regula vias de sinalização que levam a contração e ao crescimento do músculo liso vascular, migração e inflamação. O  $H_2O_2$  também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (Griedling *et al.*, 2000; Szocs *et al.*, 2002).

Dentre as enzimas oxidantes, a NADPH oxidase é a mais importante fonte geradora de ânion superóxido, sendo constituída por diferentes subunidades: gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (proteína G de baixo peso molecular) (Griendling *et al.*, 2000).

Outra fonte geradora de EROs é a xantina oxidase que utiliza a xantina, hipoxantina ou a NADH na geração de EROs enquanto a mieloperoxidase além de formar EROs utiliza o NO para gerar espécies reativas de nitrogênio provocando redução da biodisponibilidade do NO e aumento do estresse oxidativo (Gaut *et al.*, 2002; Harrison, 2002). As três isoformas da NOS também podem promover a formação de  $O_2^{\bullet-}$  quando estão desacopladas. Na eNOS o desacoplamento é causado pela ausência dos co-fatores L-arginina e tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Andrews & Mayer, 1999, Förstermann & Sessa, 2012).

Outro aspecto que deve ser considerado são os diferentes tipos de mecanismos intracelulares e extracelulares associados a atividades enzimáticas que compõem o sistema antioxidante. Esses mecanismos irão se contrapor a ação das EROs e do estresse oxidativo. Nos vasos pode-se considerar as três isoformas da SOD, a catalase e a glutathione peroxidase como o principal sistema antioxidante. As diferentes isoformas da SOD catalizam a reação que transforma o ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo a SOD extracelular (ECSOD) a isoforma mais encontrada nos vasos. A glutathione peroxidase, que é importante em baixos níveis de estresse oxidativo, transforma o  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . Enquanto a catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetivo quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Cai, 2005; Sindhu *et al.*, 2005; Gongora *et al.*, 2006).

Situações onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer, artrites, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Griendling & Fitzgerald, 2003; Navas-Acien *et al.*, 2005b; Prozialeck *et al.*, 2006 e Valko *et al.*, 2006).



Quanto a capacidade do cádmio em induzir a geração EROs parece estar relacionada a mecanismos indiretos, visto que o cádmio é um metal redox-estável. Entre os mecanismos propostos, pode-se destacar a ligação a grupos sulfidril (-SH) de proteínas levando a inativação de antioxidantes que possuem composto tiol, em especial a redução da glutathione, um importante antioxidante citoplasmático (Ercal *et al.*, 2001; Pompella *et al.*, 2003). Como resultado ocorre aumento na produção de EROs como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Manca *et al.*, 1994; Bagchi *et al.*, 1997; Liu & Jan, 2000). Adicionalmente, há evidências que o cádmio aumenta EROs em torno do aumento da peroxidação lipídica e dano oxidativo do DNA (Kamiyama *et al.*, 1995; Bagchi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008; Waisberg *et al.*, 2003). Djukic-Dosic *et al.*, 2008 demonstraram a capacidade do cádmio em promover peroxidação lipídica e aumento de ferro hepático em camundongos após 24 horas de uma única dose oral de cádmio.

Também, estudos demonstram que metais pesados, entre eles o cádmio induzem a inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), podendo levar a depleção de NADPH e glutathione e subsequente morte celular (Tian *et al.*, 1999; Wolf & Baynes, 2007). Outra importante enzima tiol é a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), assim como a G6PDH esta enzima esta sujeita a modificações no estresse oxidativo (Ciolino & Levine, 1997). A inibição dessas enzimas e a consequente depleção de ATP produzem citotoxicidade e apoptose (Lest *et al.*, 1997; Terminella *et al.*, 2002). Ao nível celular, o cádmio induz ambos os processos de reparação e danos, no qual o estado redox celular desempenha um papel crucial. Não sendo redox-ativo, o cádmio é incapaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) diretamente, mas o estresse oxidativo induzido por ele é um fenômeno comum observado em vários estudos (Cuypers *et al.*, 2010).

## 1.8 Via da Ciclooxygenase (COX)

Os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase participam na regulação do tônus vascular tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Eles atuam sobre o leito vascular promovendo tanto a vasoconstrição como a vasodilatação. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de ácido araquidônico e da atividade das ciclooxygenases e das sintases das prostaglandinas (Davidge, 2001; Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005, 2007).

Os prostanóides possuem como precursores o ácido araquidônico, o qual é liberado pelos fosfolípídeos da membrana, sob ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e sofre ação da prostaglandina H sintase também denominada de ciclooxygenase (COX). Há duas isoformas principais da ciclooxygenase, denominadas ciclooxygenase-1 (COX - 1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas (PG) e do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). A COX-1, considerada a isoforma constitutiva, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas (Smith *et al.*, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e tem a expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995, Antman *et al.*, 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em Prostaglandina H<sub>2</sub> e esta por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) ou TXA<sub>2</sub> (Mardini & FitzGerald, 2001). Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a formação de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores derivados da COX, contribuindo para manutenção do tônus vascular. Contudo, em algumas doenças vasculares a

produção de prostanóides constritores encontra-se aumentada (Vanhoutte *et al.*, 2005).

Uma vez secretados pelas células que os sintetizam, os prostanóides exercem seus efeitos via receptores específicos: TP para o TXA<sub>2</sub>; IP para a PGI<sub>2</sub>; FP para o PGF<sub>2α</sub>; DP para a PGD<sub>2</sub> e para a PGE<sub>2</sub> são descritos 4 subtipos de receptores denominados EP<sub>1</sub> – EP<sub>4</sub>. Esses receptores apresentam mecanismos diferenciados, relacionando-se de acordo com a subunidade na qual o mesmo se encontra ligado a proteína G. Sendo que, aquele grupo de receptores acoplados à proteína Gs promove ativação da AC, aumento do AMPc e consequente relaxamento do músculo liso. Ao passo que, os receptores EP<sub>1</sub>, FP e TP encontram-se acoplados à proteína Gq e quando são estimulados controlam o aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e assim vasoconstrição. Este mesmo efeito é provocado pela ativação dos receptores EP<sub>3</sub> os quais são acoplados à proteína Gi. Quando ativados esses receptores promovem inibição da AC, diminuído a formação de AMPc resultando em vasoconstrição (Funk, 2001; Wright *et al.*, 2001).

Ramirez & Gimenez (2003) demonstraram que a exposição *in vivo* Cd altera o equilíbrio redox em macrófagos peritoneais de rato, levando a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, e sobrecarregando as defesas antioxidantes. Além disso, o mesmo grupo demonstrou neste mesmo modelo um aumento da peroxidação lipídica e consequente aumento da liberação de ácido araquidônico (AA), maior produção de óxido nítrico e prostaglandina E<sub>2</sub>, com indução da iNOS e da ciclooxigenase-2 em comparação com os macrófagos de controles. Em adição, Suzuki *et al.* (1989) e Romare & Lundholm (1999) demonstraram separadamente que a exposição *in vitro* ao cádmio induz expressão de COX-2 e a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> em osteoblastos de camundongos. Apesar de vários estudos

disponíveis na literatura que demonstram a possível relação entre cádmio e indução de COX-2 não encontramos demonstrados os efeitos do cádmio sobre a via da ciclooxigenase na reatividade vascular à fenilefrina em aorta de ratos.

### **1.9 Sistema Renina-Angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (SRA) faz parte de um complexo sistema hormonal e exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea e na homeostase dos fluídos corporais, sendo esse sistema circulante e também local presente em diferentes tecidos como: cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (Dzau, 1989; Danser, 1996; Bader *et al.*, 2001). O SRA desempenha papel vital no controle da função dos sistemas cardiovascular e renal, pois a angiotensina II, principal substância efetora deste sistema, participa do controle do tono vascular e na manutenção da pressão arterial em níveis adequados. Além disso, sabe-se que o SRA local ou tecidual refere-se a um sistema peptidérgico com características de uma glândula endócrina (Paul *et al.*, 2006).

A angiotensina II atua diretamente sobre receptores específicos localizados nas células do músculo liso vascular ou atua através da liberação de aldosterona pela estimulação da adrenal (Quinn & Williams, 1988; Hackenthal, *et al.*, 1990; Deschepper, 1994; Hall, 2003; Persson *et al.*, 2004).

A angiotensina II atua em dois tipos de receptores específicos os da angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>) que são amplamente distribuídos por todos os órgãos e nos angiotensina tipo 2 (AT<sub>2</sub>). A ação da angiotensina II sobre os receptores AT<sub>1</sub> são as que caracterizam seus efeitos clássicos. No entanto os receptores da angiotensina tipo 2 (AT<sub>2</sub>) quando estimulados antagonizam os efeitos dos receptores AT<sub>1</sub> e exercem efeito anti-proliferativo e anti-apoptótico. Os receptores AT<sub>2</sub> são importantes

na regulação do crescimento, na diferenciação e na regeneração do tecido nervoso, mas após o nascimento ocorre redução da sua expressão, expressão esta que pode ser induzida em algumas condições patológicas (Griedling, *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005).

A atuação da angiotensina II no receptor AT<sub>1</sub> ocorre por vias mediadas por proteínas G, tirosinas-quinases e por receptores não-tirosina-quinases. A angiotensina II além de alterar a reatividade vascular exerce importante ação pró-inflamatória na parede vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Schiffrin, 2005; Pauletto & Rattazzi, 2006) que participam das respostas inflamatórias presentes nas doenças vasculares. A angiotensina II também estimula a liberação de prostaglandinas em células do músculo liso, e também em outros tipos celulares, através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (Freeman *et al.*, 1998).

Além disso, a angiotensina II regula a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em células do músculo liso vascular (Ohnaka *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002, Alvarez *et al.*, 2007) e em fibroblastos adventiciais através da ativação dos receptores AT<sub>1</sub> (Beltrán *et al.*, 2009). Devido a isto alterações no sistema renina-angiotensina estão associadas ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência renal e cardíaca (Rajagopalan *et al.*, 1996; Griendling *et al.*, 2000; Ohtsu *et al.*, 2005).

A hipertensão induzida pelo cádmio em experimentos animais pode ser relacionada a mudanças no sistema renina-angiotensina. Entretanto, mudanças nesse sistema são dependentes de dose de exposição, via de administração do metal, tempo de exposição, espécie, idade e sexo dos animais (Luz *et al.*, 1998). Há cada vez mais evidências na literatura demonstrando a relação da ativação do

sistema renina-angiotensina na fisiopatologia da lesão tecidual induzida por cádmio (Davalli *et al.*, 1992; Lall *et al.*, 1997; Varoni *et al.*, 2010).

A angiotensina II também exerce efeito sobre leito vascular através da indução do estresse oxidativo levando ao aumento do anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas através da ativação da NADPH oxidase (Cai *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005) que é a principal fonte de produção por espécies reativas de oxigênio induzidas pelo cádmio (Souza *et al.*, 2009; Banakou e Dailianis, 2010).

Conforme expostos nesta breve revisão, pode-se notar que o cádmio possui a capacidade de alterar a função endotelial. Entretanto os mecanismos envolvidos nesses processos devem ser melhor esclarecido, visto que, a maioria dos estudos encontrados analisa os efeitos da exposição ao cádmio por períodos prolongados de três meses ou mais, ou por períodos curtos com concentrações elevadas do metal. Há uma escassez de estudos que avaliam os efeitos do cádmio sobre a reatividade vascular à fenilefrina de maneira aguda. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de novos estudos para se compreender a toxicidade desse metal sobre os vasos sanguíneos, sua influência sobre a função endotelial e uma possível associação com desenvolvimento de hipertensão e aterosclerose, processo que ocorre em artérias de grande calibre como a aorta.

Assim, este trabalho visa avaliar os efeitos da exposição aguda ao cloreto de cádmio em anéis de aorta de ratos, visando esclarecer mais detalhadamente os efeitos tóxicos desse metal em vasos de condutância.

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver modelo experimental de exposição “*in vitro*” ao cloreto de cádmio e investigar as possíveis alterações promovidas, pela exposição ao CdCl<sub>2</sub>, na reatividade vascular da aorta torácica de ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar se a exposição aguda ao CdCl<sub>2</sub> promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina da aorta torácica;

Verificar se essa exposição ao com CdCl<sub>2</sub> altera a participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina;

Estudar a participação das espécies reativas ao oxigênio, dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2 e do sistema renina-angiotensina na reatividade vascular à fenilefrina da aorta de ratos expostos ao CdCl<sub>2</sub>;

Avaliar se a exposição ao CdCl<sub>2</sub> altera a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico, do receptor da angiotensina AT<sub>1</sub>.

Verificar se em anéis de aorta torácica as respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio são alteradas pela exposição aguda ao CdCl<sub>2</sub>;

### **III MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais**

Para a realização experimental deste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, com três meses de idade (10-12 semanas), normotensos, pesando entre 250-300 gramas. Estes foram cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em gaiolas, sobre condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e alimentação.

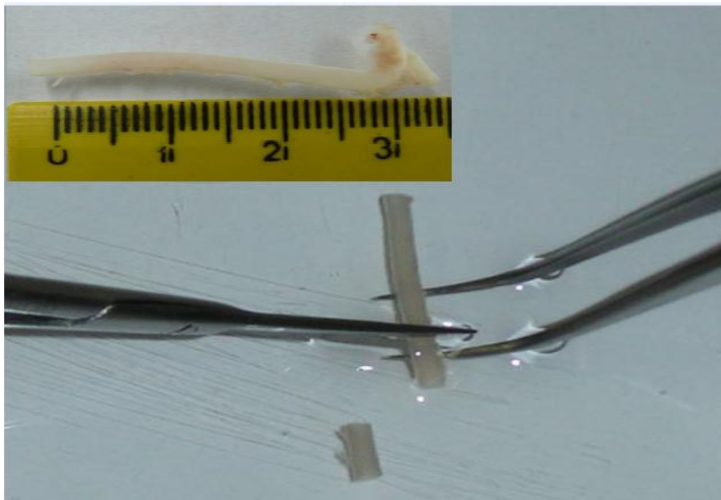
Os procedimentos executados nesta pesquisa estavam em conformidade com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da EMESCAM- CEUA 004/2007.

#### **3.2 Metodologia empregada para estudo de reatividade em anéis isolados de aorta de rato**

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental<sup>®</sup>) na dose de 50 mg/kg, via intraperitoneal e em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo



solução de Krebs- Henseleit (composição em mM: NaCl 127; KCl 4.7; NaHCO<sub>3</sub> 18; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2.5 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.2; glicose 11 e EDTA 0.01). A aorta foi então delicadamente manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo, e então dividida em 6-8 segmentos cilíndricos com 3-4 mm de comprimento como demonstrado (Figura 6).



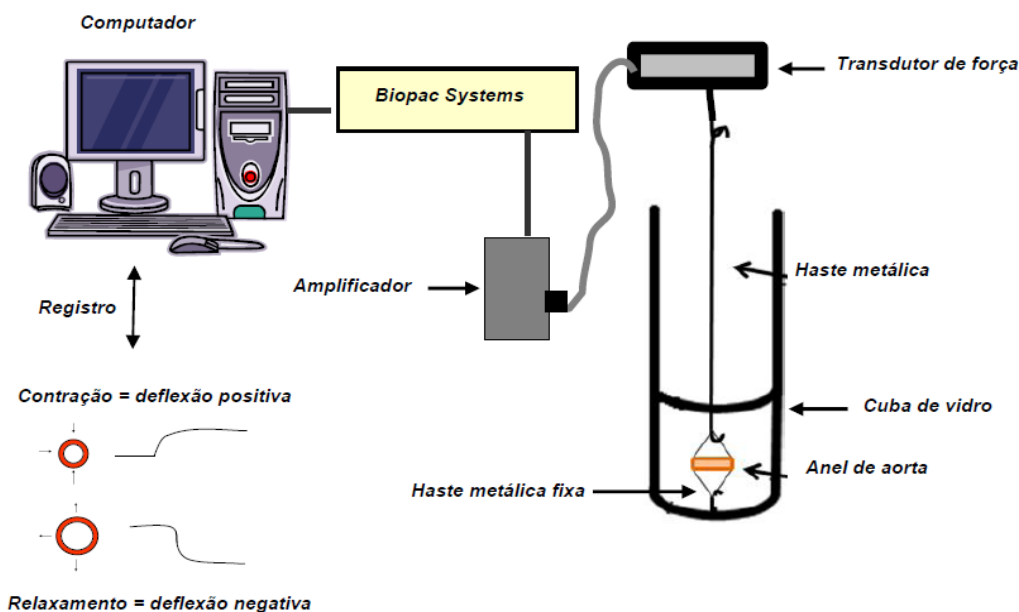
**Figura 6:** Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.

Após a manipulação os segmentos foram adaptados ao aparato experimental. Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs Henseleit mantida aquecida a 37 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), mantendo o pH estável em 7,4 de acordo com método descrito por Marín *et al.*, (1988).

Para a montagem da preparação experimental dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permanecessem paralelos. Um fio foi fixado a uma haste fixa à parede da cuba e o outro conectado verticalmente a uma haste móvel presa a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração no diâmetro do vaso era capitada

pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados e este a um computador (PC Pentium) (Figura 7).

Após a montagem os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1g, reajustada, quando necessário, durante aproximadamente 45 minutos de estabilização.



**Figura 7:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *“in vitro”*. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado Dias, 2007).

### 3.3 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de estabilização (Figura 8A), foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 75 mM ao banho, para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, assim, avaliar a viabilidade do músculo liso vascular (Figura 8B). Quando obtinham uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornarem a tensão de repouso (Figura 8 B, C). Dessa forma, aqueles anéis que não obtiveram tal contração foram descartados.

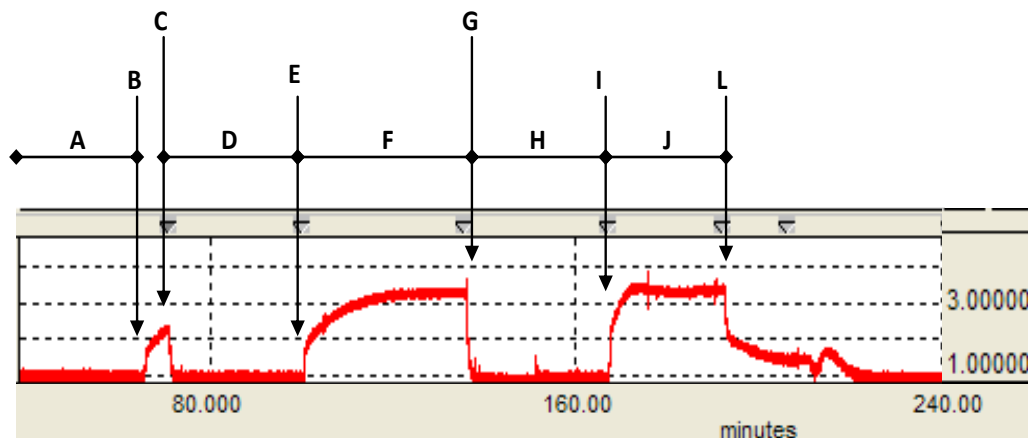
Após 30 minutos de estabilização (Figura 8 D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 8 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para que retornassem à tensão de repouso e, depois de 30 minutos (Figura 8 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

### **3.4 Avaliação da integridade funcional do endotélio**

A viabilidade endotelial foi avaliada por meio de uma pré-contracção com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Essa única concentração induziu aproximadamente 75 % da contração máxima ao KCl 75 mM. Após a contração seguiu-se a indução do relaxamento produzido através da adição de acetilcolina  $10^{-5}$  M (Figura 8 I, J, L). A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a acetilcolina foi capaz de induzir relaxamento igual ou superior a 85% de relaxamento à fenilefrina. Os anéis que relaxaram menos que 85% do platô foram descartados.

Nos protocolos em que foi avaliada a modulação do endotélio nas ações do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina. Os anéis foram submetidos a uma remoção mecânica desta camada com o auxílio de uma haste de aço inoxidável que foi inserida na luz do vaso e friccionada à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M induzir relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina.

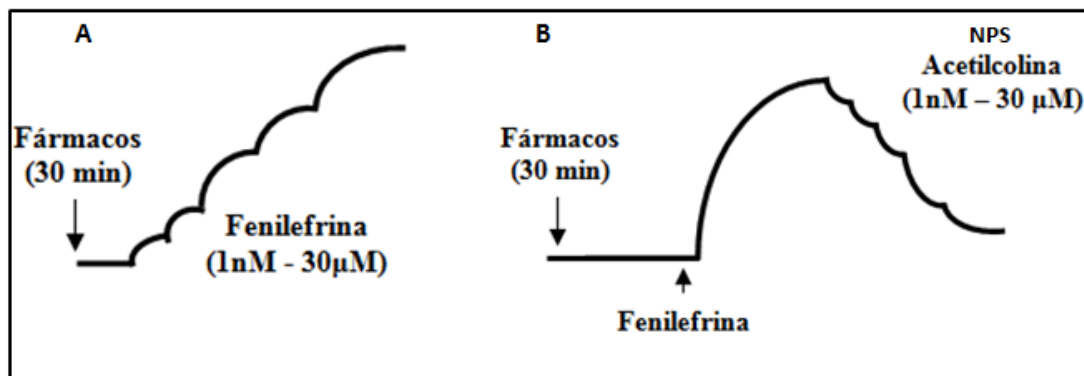
A figura abaixo é um registro típico que ilustra os protocolos experimentais acima descritos:



**Figura 8:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 gramas); **B)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio:** **I)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$  M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (Dias, 2011).

### 3.5 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina, à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio.

Após a realização do teste de integridade do endotélio os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, esses anéis foram submetidos aos diferentes protocolos experimentais, objetivando o estudos dos efeitos à exposição aguda ao cádmio,  $10\mu\text{M}$ , na reatividade vascular. Após a incubação, foi realizada a curva concentração-resposta ( $1\text{ nM}$  a  $30\text{ }\mu\text{M}$ ) à fenilefrina ou à acetilcolina ou à nitroprussiato de sódio (NPS) na presença ou ausência do cádmio. O tempo de incubação/exposição para este metal foi 45 minutos antes do início da curva de concentração-resposta. Abaixo o esquema representativo das curvas concentração-resposta.



**Figura 9:** A) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração resposta à fenilefrina; B) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração resposta à acetilcolina ou nitroprussiato de sódio (Modificado de Peçanha 2009).

### 3.6 Efeito do cádmio (10 µM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

Para avaliar o efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE, 1 nM a 30 µM) na presença e na ausência de cádmio (10 µM). O efeito do cádmio na resposta contrátil à fenilefrina, foi calculado como percentual de resposta ao KCl (75 mM).

### 3.7 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e não-dependente do endotélio

#### 3.7.1 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio

Curvas concentração-resposta ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS, 1 nM a 30 µM), foram utilizadas para avaliar o relaxamento não-dependente do endotélio. As curvas foram realizadas na presença ou na ausência

de cádmio ( $10\ \mu\text{M}$ ). As curvas eram iniciadas assim que a pré-contracção com fenilefrina  $10^{-6}\ \text{M}$  atingisse um platô. O efeito do cádmio na resposta vasodilatadora à NPS foi calculado como percentual de resposta ao relaxamento à FE.

### **3.7.2 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio**

Para avaliar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh,  $1\ \mu\text{M}$  a  $30\ \mu\text{M}$ ) em anéis de aorta pré-contráidos com fenilefrina. As curvas foram realizadas na presença ou na ausência de cádmio ( $10\ \mu\text{M}$ ). As curvas eram iniciadas assim que a pré-contracção com fenilefrina  $10^{-6}\ \text{M}$  atingisse um platô. O efeito do cádmio na resposta vasodilatadora à ACh foi calculado como percentual de resposta ao relaxamento à FE.

## **3.8 Modulação do endotélio nas ações do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular o efeito do cádmio sobre a resposta constritora à fenilefrina, em alguns experimentos, o endotélio foi removido mecanicamente, como descrito anteriormente. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}\ \text{M}$  em induzir relaxamento, após pré-contracção com fenilefrina.

Sendo assim, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-), na presença e na ausência de cádmio.

## **3.9 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Para avaliar as possíveis vias de atuação do cádmio para modificar a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos, foram utilizadas algumas intervenções farmacológicas.

Sendo assim, os protocolos de reatividade vascular foram conduzidos da seguinte forma: curvas concentração-resposta à FE (1  $\eta$ M a 30  $\mu$ M) foram realizadas após incubação do fármaco a ser estudado e após incubação conjunta do fármaco com o cádmio. Além disso, o efeito desses fármacos foi avaliado simultaneamente na ausência de cádmio. O tempo de exposição ao cádmio foi de 45 min antes da realização da curva concentração-resposta à fenilefrina (1  $\eta$ M a 30  $\mu$ M). Já os fármacos eram incubados 30 minutos antes do início da curva de fenilefrina.

É importante ressaltar que, em cada segmento vascular, foi realizada apenas uma curva concentração-resposta à fenilefrina para evitar o tempo prolongado de experimento, já que isso resultaria em prejuízo na preparação utilizada nesse estudo.

### **3.10 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, com L-NAME, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Para avaliar a influência do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi utilizado o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M).

Após o teste de integridade do endotélio e posterior ao retorno da tensão de repouso os anéis de aorta foram expostos ou não a 10 $\mu$ M de cádmio. Posterior, com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico no efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-

resposta à FE, após incubação com 100  $\mu$ M de L-NAME e após incubação conjunta de L-NAME (100  $\mu$ M) e cádmio (10  $\mu$ M).

### **3.11 Análise da participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina**

A fim de investigar a participação do sistema renina-angiotensina local e das espécies reativas do oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) na resposta contrátil a fenilefrina foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença de Losartan (10  $\mu$ M), bloqueador dos receptores angiotensinoginérgicos AT<sub>1</sub>; Enalapril (10  $\mu$ M), inibidor da enzima conversora da angiotensina ECA; Apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPH oxidase; Superóxido Dismutase (SOD, 150 U/ml), “*scavenger*” do ânion superóxido e Catalase (1000 U/ml), “*scavenger*” do peróxido de hidrogênio, uma co-incubação (catalase + SOD).

Sendo assim, com a finalidade de avaliar a participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio no efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE, após incubação com os fármacos descritos independentemente e após incubação conjunta dos mesmos com cádmio (10  $\mu$ M).

Todos os fármacos foram adicionados à preparação 30 minutos antes do início da curva concentração-resposta a fenilefrina.

### **3.12 Análise da participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina**



Com o objetivo de estudar a influência dos prostanóides da via da ciclooxigenase na vasoconstrição induzida pela fenilefrina, foram utilizados os seguintes fármacos: Indometacina (10  $\mu$ M), inibidor não específico da ciclooxigenase; NS 398 (1  $\mu$ M), inibidor específico da ciclooxigenase-2 (COX-2); SQ 29,548 (1  $\mu$ M), antagonista do receptor TP - receptor do tromboxano  $A_2$  e da prostaglandina  $H_2$ ; SC 19,220 (10  $\mu$ M), antagonista do receptor  $EP_1$ ; e furegrelato (10  $\mu$ M) inibidor da síntese do tromboxano  $A_2$ .

Assim, para avaliar a participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase no efeito do cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina após incubação com os fármacos descritos independentemente e após incubação conjunta dos mesmos com cádmio (10  $\mu$ M). Estes fármacos foram adicionados à preparação 30 minutos antes do início da curva de fenilefrina.

### **3.13 Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com cádmio**

A liberação local de NO foi avaliada conforme o método descrito por Martín *et al.*, (2005). Para a realização desse protocolo, os anéis obtidos foram estabilizados durante 30 minutos em tampão HEPES (em mmol/L: NaCl 119; HEPES 20;  $CaCl_2$  1,2; KCl 4,6;  $MgSO_4$  1;  $KH_2PO_4$  0,4;  $NaHCO_3$  5; glicose 5,5;  $NaH_2PO_4$  0,15; pH 7,4) a 37° C. Depois do período de estabilização, os anéis foram incubados com o produto fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF- 2  $\mu$ mol/L, diluído em tampão HEPES) durante 30 minutos, a 37° C, e a solução foi coletada para medida da liberação basal de NO. Em seguida, foi realizada a medida da liberação de NO após incubação com cádmio (10  $\mu$ M). Para isso, um anel foi incubado com cádmio

durante 45 minutos, a 37° C. O outro anel foi utilizado como controle, permanecendo também, durante 45 minutos, a 37° C. Após os 45 minutos, uma curva concentração-resposta à fenilefrina (1 nM a 30 µM) foi realizada em ambos os anéis, com o objetivo de mimetizar as mesmas condições dos experimentos conduzidos no estudo de reatividade vascular. Em seguida, a solução foi novamente coletada para a medida da liberação de NO.

A produção de NO foi estimada a partir da intensidade de fluorescência do DAF. A fluorescência da solução foi medida em temperatura ambiente usando um espectrofluorímetro (Biotek Sinergy™ 2 Instruments, Biotek's Gen 5™ Software), com filtros de excitação no comprimento de onda de 492 nm e de emissão, no comprimento de onda de 515 nm. Para determinar a emissão basal de fluorescência do DAF, foi realizada a medida da fluorescência da solução sem a presença do anel de aorta. A quantidade de óxido nítrico liberada foi expressa como unidades arbitrárias/mg de tecido.

### **3.14 Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS), eNOS fosforilada e receptor AT1.**

Os anéis de aorta, submetidos ou não à incubação com cádmio (10 µM), nos experimentos de reatividade vascular eram coletados, congelados e mantidos a -80°C até o momento da extração proteica.

#### **3.14.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas**

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos anéis de aorta em solução tampão composta de: Tris- HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO<sub>3</sub> (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich®).

A homogeneização foi realizada em baixa temperatura, onde, durante todo o procedimento, o homogeneizador de vidro era mantido em um recipiente com gelo. Após a homogeneização do tecido, essa mistura foi acondicionada em microtubos e centrifugada (Eppendorf-Neitheir-Hinz, Gmb 22331, Alemanha) a 6000 rpm durante 12 minutos, a 4°C, para recolher a fase proteica solúvel (sobrenadante). Em seguida, foi realizada a quantificação proteica pelo método de Bradford (1976) através do espectrofotômetro (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil).

Pequenas alíquotas contendo 80 µg de proteína foram preparadas a partir de diferentes volumes do homogenato. Para obter igualdade de volume nas alíquotas, o volume final foi completado com a solução tampão de homogeneização.

#### **3.14.2 Eletroforese e Transferência das Amostras**

Alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e Azul de bromofenol 0,5 %).

As amostras foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida 7,5% (acrilamida 40%, glicerol 100%, Tris HCl 1,5M pH 8,8, SDS 10%, persulfato amônico APS 10% e Temed), previamente imersos em cuba contendo tampão para eletroforese, e submetidas à eletroforese durante aproximadamente três horas, aplicando uma corrente constante de 80 V (PowerPac<sup>TM</sup> HC, BioRad, Singapura). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK), através da montagem do sistema de sanduíche (papel de Whatman, membrana, gel e novamente papel de Whatman), banhado por solução tampão de transferência (Tris-base 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20% e SDS 0,1 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 25 V durante uma hora, à temperatura de 4°C no aparelho Semi-dry (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

### 3.14.3 Incubação dos anticorpos

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por duas horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tris-base 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) sob constante agitação mecânica, para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos.

Em seguida, sob agitação constante, a 4°C, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-eNOS (1:250, BD Biosciences), anti-p-eNOS<sup>Ser1177</sup> (1:250; BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup>, Lexington, UK) e AT<sub>1</sub> (1:500, Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA) e  $\alpha$ -actina (anticorpo monoclonal, 1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) diluídos em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5).

Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T, por 30 minutos (seis lavagens com duração de cinco minutos cada), sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente, com anticorpo secundário durante uma hora, sob agitação constante. Foi utilizado imunoglobulina IgG anti-mouse para a eNOS e  $\alpha$ -actina (1:5000, Stressgen Bioreagents).

Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos, com troca da solução de TBS-T, a cada cinco minutos. Em seguida, realizou-se mais uma etapa de lavagem por mais 30 minutos, utilizando a solução TBS-T sem a presença do tween-20, com troca da solução a cada 10 minutos.

### 3.14.4 Detecção das proteínas

As proteínas correspondentes à eNOS, p-eNOS, AT<sub>1</sub> e  $\alpha$ -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência, por meio da exposição das membranas, durante cinco minutos, a um sistema de detecção (ECL Plus,

Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham<sup>TM</sup>, UK), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, foi utilizado o programa ImageJ, após digitalização dos filmes com auxílio de um scanner.

O Western blot para essas quatro proteínas foi realizado na mesma membrana. Sendo assim, para a obtenção da eNOS e  $\alpha$ -actina, foi necessário realizar o “*stripping*” da membrana, logo após a revelação das bandas para a peNOS<sup>Ser1177</sup> e AT1. Para isso, as membranas foram submetidas a duas incubações com solução tampão de “*stripping*” (Glicina 200 mM, SDS 0,1% e Tween 1%, pH 2,2), cada uma com duração de 10 minutos. Em seguida, outras duas incubações foram realizadas na presença de PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 100mM, pH 7,4), cada uma com duração de 10 minutos, sendo este processo finalizado com mais duas lavagens na presença da solução de TBS-T, cada uma com duração de 5 minutos. Após efetuar o “*stripping*”, as membranas foram bloqueadas e as etapas seguintes são similares ao que foi descrito anteriormente.

### 3.15 Expressão dos resultados e análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressos em porcentagem (%).

Para cada curva concentração-resposta à fenilefrina foram calculados os valores de resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>). Para isso, foi realizada uma

análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esse agonista.

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina, resultados foram expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão proteica da eNOS e AT<sub>1</sub> estão expressos como a relação entre a densidade ótica para eNOS ou AT<sub>1</sub> em relação à  $\alpha$ -actina. Já os resultados da eNOS fosforilada, estão expressos como a relação entre a densidade ótica para eNOS fosforilada em relação à eNOS.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student*, não-pareado, e análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas ou completamente randomizadas, seguida pelo teste *post-hoc* de *Tukey*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

O programa estatístico GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise e apresentação gráfica dos dados obtidos.

### **3.16 Fármacos e reagentes utilizados**

- 4,5-diaminofluoresceína (DAF) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''- tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de bromofenol) (Sigma)
- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)

- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-eNOS (Anti-eNOS, BD Biosciences)
- Anticorpo de camundongo  $\alpha$ -actina (Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Stressgen Bioreagents )
- Anti-imunoglobulina G de coelho (Stressgen Bioreagents)
- Apocinina (Fluka)
- Bicarbonato de Sódio (VETEC)
- Cádmio (Sigma)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de Potássio (Merck)
- Cloreto de Sódio (VETEC)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC)
- DL-ditioneitol (DTT) (Sigma)
- Enalapril (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF, Inibidor de Protease) (Sigma)
- Fluoreto de sódio (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Fosfato diácido de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (VETEC)
- Furegrelato (Cayman Chemical)
- Glicerol (Sigma)
- Glicina (Sigma)

- Glicose (VETEC)
- Hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma)
- Inibidor de protease (Cocktail for General Use) (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Lauril sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- Metavanadato de sódio ( $\text{NaVO}_3$ ) (Sigma)
- NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Cayman

Chemical)

- $\text{N}^\circ$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- N,N'-Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N,N,N',N'-tetrametil-etinodiamina (Temed) (Sigma)
- Ouabaína, octahidrato (Sigma)
- Persulfato amônico (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Twenn 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western blot (ECL Plus, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK).
- SQ 19,548 (Ácido [1S-[1 alfa,2 beta (5Z),3 beta,4 alfa]-7-[3-[[2-  
[[fenilamino) carbonil]hidrazin]metil]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5-heptenoico)

(Cayman Chemical)

- SC 19,220 (Cayman Chemical)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Merck)



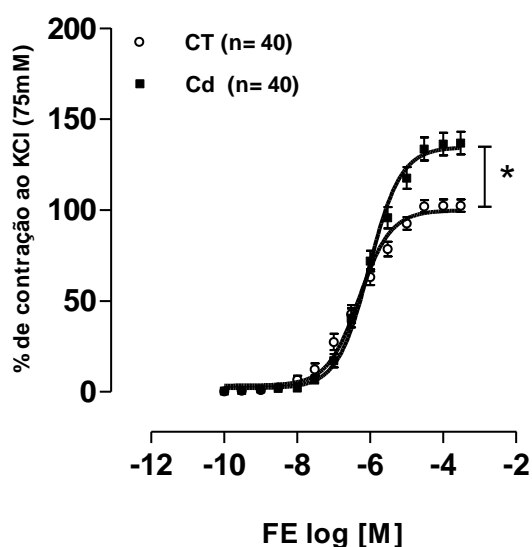
- Superóxido dismutase (Sigma)
- Tetraetilamônio, cloridrato (TEA) (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminomenato (Tris) (Sigma)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)

A solução de Krebs-Henseleit foi armazenada sob-refrigeração e as demais soluções usadas nos protocolos de reatividade vascular, foram dissolvidas em água destilada e mantidas no congelador a temperatura de -20°C. Exceções de diluição: indometacina que foi dissolvida em solução de tampão tris 0,1M (pH 7,4); SQ 19,548 e NS 398 que foram dissolvidos em etanol absoluto e SC 19,220 que foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO).

## **IV RESULTADOS**

### **4 Efeitos da exposição aguda ao cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos.**

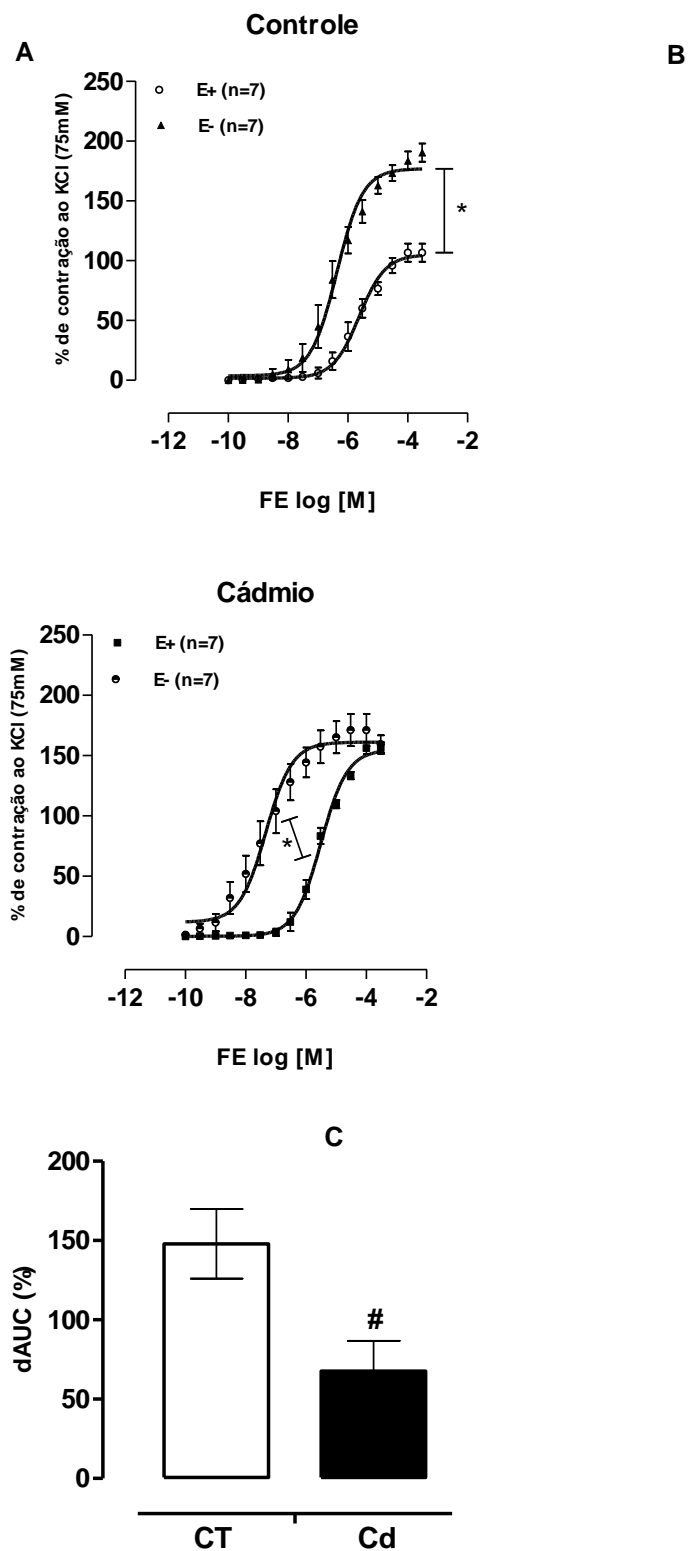
A fenilefrina (agonista  $\alpha_1$  adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos controle e cádmio, no entanto, a resposta máxima foi maior nos segmentos arteriais dos animais do grupo cádmio. A resposta a fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl (Figura 10).



**Figura 10:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (CT) e cádmio (Cd). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) foi utilizado o Teste  $t$  não pareado: \* $P < 0,05$  controle vs cádmio\*.

#### 4.1 Participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina

Com o objetivo de avaliar a participação do endotélio na resposta vascular a fenilefrina o endotélio vascular foi removido e, a ausência dessa camada foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10^{-5}$  M) induzir relaxamento maior que 10%. A ausência do endotélio promoveu aumento significativo da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nos segmentos aórticos de animais dos grupos controle e cádmio (Figura 11A e 11B). Porém, quando comparados os resultados do efeito da ausência do endotélio, por meio da dAUC, entre os animais de ambos os grupos experimentais foi observado efeito de menor magnitude nos animais do grupo cádmio.



**Figura 11:** Efeito da retirada mecânica do endotélio vascular sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). (%dAUC, CT; E+/E- 147,95 ± 21,9 Cd; E+/E- 67,63 ± 19,04). Os resultados, média ± EPM, estão expressos como porcentagem da

contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAUC foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  E<sup>+</sup> vs E<sup>-</sup>. #  $P < 0,05$  controle vs cádmio.

**Tabela 1:** Valores de  $pD_2$  e resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ , % de contração) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

	$pD_2$		$R_{\text{máx}}$ (%)	
	Controle	Cádmio	Controle	Cádmio
E+	-6,07 ± 0,13	-6,01 ± 0,11	102,5 ± 3,4	156,1 ± 4,7#
E-	-7,19 ± 0,08*	-7,27 ± 0,29*	177,1 ± 3,8*	160,1 ± 7,0

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

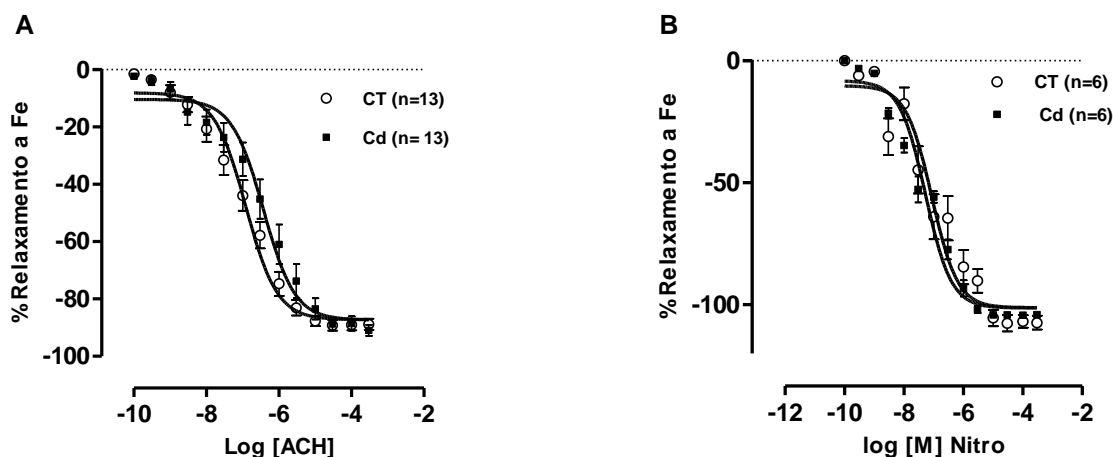
Teste t: \* $P < 0,05$  E+ vs E-. # $P < 0,05$  grupo controle vs grupo cádmio.

Os resultados apresentados demonstraram que a exposição aguda ao cádmio promove alterações na resposta constritora à fenilefrina em anéis de aorta de ratos e que esses efeitos são dependentes do endotélio. Adicionalmente, como a modulação endotelial apresentou-se menor no grupo cádmio, os resultados apresentados sugerem que esse metal pode reduzir a liberação de um fator vasodilatador e/ou aumentar a liberação de um vasoconstrictor de maneira dependente do endotélio. Portanto, o próximo passo do presente estudo foi avaliar as possíveis vias envolvidas nesses efeitos a partir de análises funcionais e bioquímicas.

#### 4.2 Respostas vasculares a acetilcolina e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS)

A exposição à acetilcolina (1  $\eta$ M a 30  $\mu$ M) e ao NPS (1  $\eta$ M a 30  $\mu$ M) promoveu relaxamento concentração-dependente nos anéis de aorta torácica, de ambos os grupos, estes anéis foram previamente incubados com dose de 10 $\mu$ M de cádmio por 45 min. e após esse período expostos a dose de fenilefrina suficiente para promover pré-contracção correspondente a 50% da resposta máxima ao KCl. Após a estabilização da resposta contrátil à fenilefrina foi realizada a curva concentração resposta.

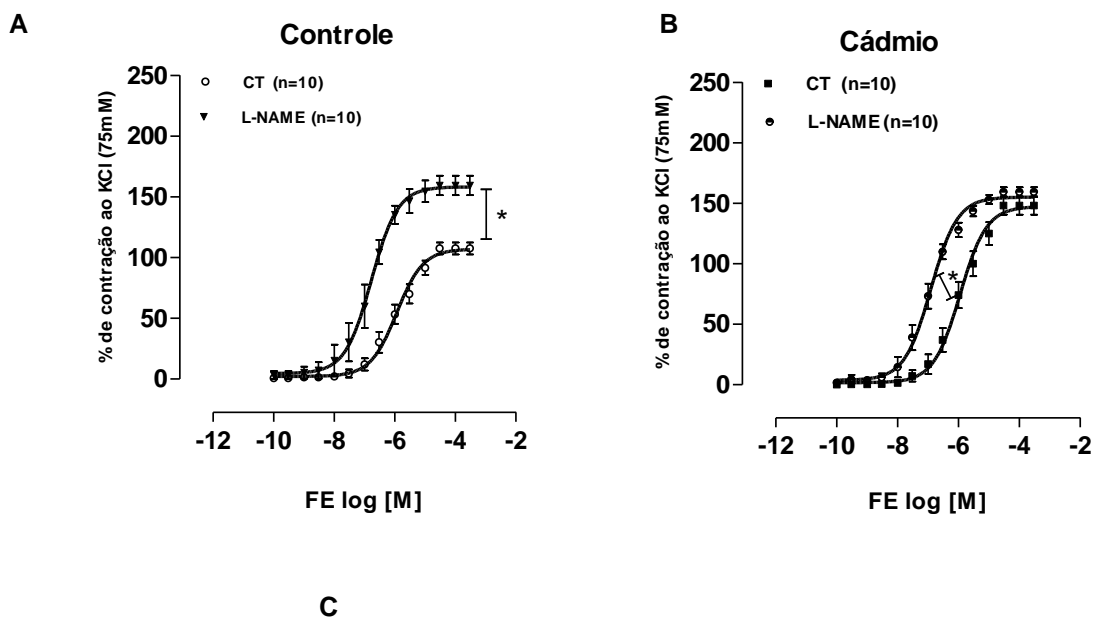
A exposição ao cádmio não promoveu alteração na resposta vascular nem a acetilcolina e nem a resposta vasodilatadora ao doador do óxido nítrico, NPS, sendo semelhante nos segmentos arteriais dos animais dos grupos Controle e Cádmio (Figura 12).

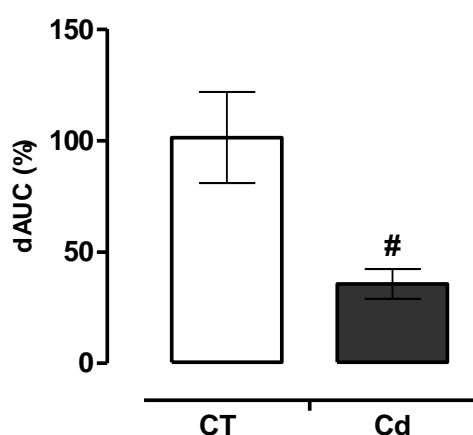


**Figura 12:** Curva concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao doador de óxido nítrico, NPS (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Cádmio pré-contráidas com fenilefrina. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t não pareado:  $P > 0,05$ .

### 4.3 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular a fenilefrina

Para entender se a exposição aguda ao cádmio alterou a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta de ratos, utilizou-se o L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase. O L-NAME provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nas artérias de animais dos grupos controle e cádmio (Figura 13A e 13B). Porém, os valores da dAUC demonstram que a participação do NO na resposta contrátil a fenilefrina está reduzida em anéis de aorta expostos ao cádmio. A diferença da participação da via do NO nos dois grupos estudados pode ser claramente observada através da diferença de área abaixo da curva (Figura 13C).





**Figura 13:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). (dAUC% Ct x Ct + L-NAME:  $117,0 \pm 15,3$  vs Cd x Cd + L-NAME:  $59,7 \pm 11,05$ ). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAUC foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs L-NAME. #  $P < 0,05$  controle vs cádmio.

**Tabela 2:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

	$pD_2$		$R_{\text{máx}}$ (%)	
	Controle	Cádmio	Controle	Cádmio
<b>Controle</b>	$-6,07 \pm 0,13$	$-6,00 \pm 0,11$	$107,5 \pm 4,9$	$148,1 \pm 7,5\#$
<b>L-NAME</b>	$-6,84 \pm 0,12^*$	$-6,93 \pm 0,10^*$	$159,3 \pm 8,0^*$	$159,2 \pm 4,0$

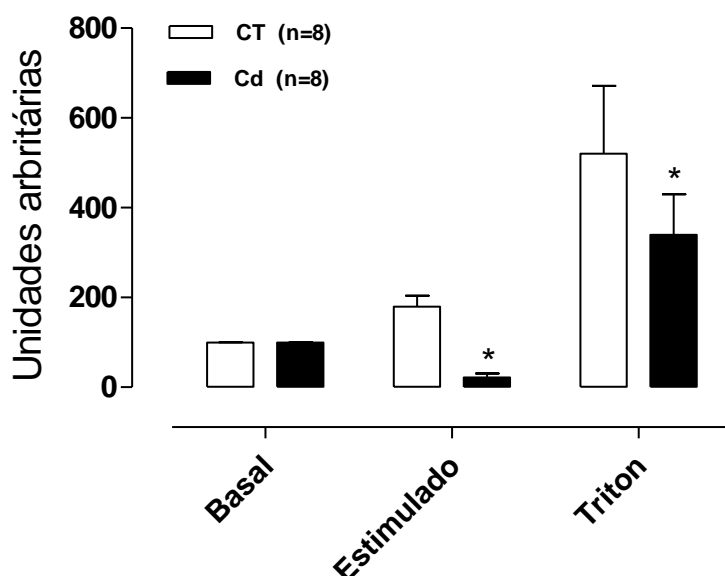
Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Teste  $t$ : \* $P < 0,05$  Curva controle vs curva + L-NAME. # $P < 0,05$  grupo controle vs grupo cádmio.



#### **4.4 Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com cádmio**

Com o objetivo de corroborar com os dados funcionais acima apresentados, foi realizada a análise da liberação local de NO na condição basal, estimulada e na presença de triton, conforme o método descrito por Martín *et al.*, (2005). Como podem ser observados os resultados funcionais corroboraram com a análise da liberação local de óxido nítrico estimulada e na presença de triton. Nessa análise foi observada menor liberação de óxido nítrico no grupo cádmio conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 14).

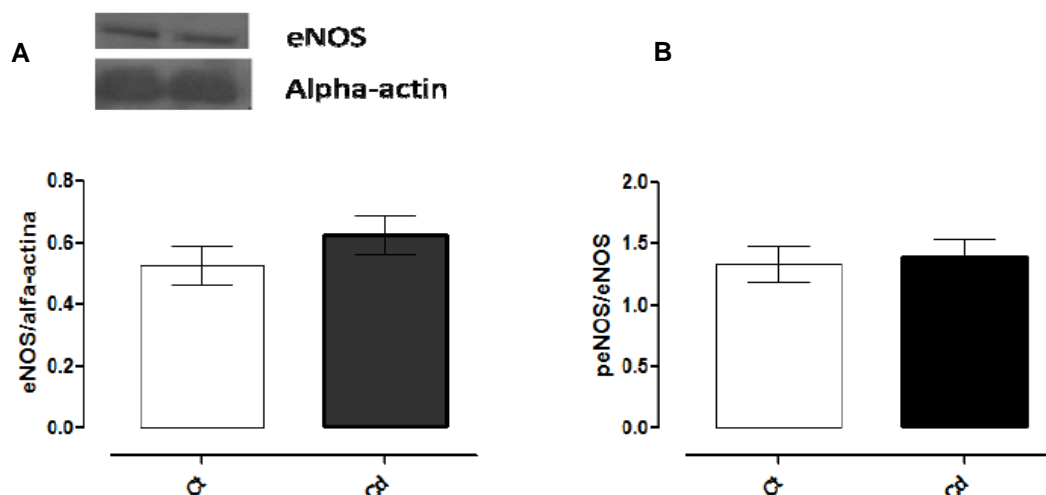


**Figura 14:** Liberação local de óxido nítrico (NO) na condição basal; estimulada e após a adição de triton com o uso de 5-diaminofluoresceína (DAF), em anéis de aorta de ratos controle (CT) e expostos ao cádmio (Cd). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido, calculados a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo DAF. Teste t não pareado.\*  $P < 0,05$  controle vs cádmio.

#### 4.5 Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e da eNOS fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>)

A expressão proteica da eNOS e p-eNOS<sup>ser1177</sup> foram avaliadas com intuito de verificar se a redução da participação do NO na reatividade vascular após exposição aguda ao cádmio também era acompanhada de alterações nas expressões dessas enzimas. A expressão da eNOS e p-eNOS<sup>ser1177</sup> em condições basais (segmentos arteriais expostos ou não ao cádmio) foram detectadas, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

Sob condições basais, a expressão proteica da isoformas eNOS e p-eNOS<sup>ser1177</sup> não mostrou-se alterada entre os grupos avaliados. (Figura 15A e 15B).



**Figura 15:** (A) Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e (B) isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos controle (n = 8) e cádmio (n = 8). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da  $\alpha$ -actina. Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da  $\alpha$ -actina; e relação entre a densidade das bandas da p-eNOS e da eNOS. Teste t não pareado:  $P > 0,05$ .

Juntos, esses resultados indicam que o cádmio induz disfunção endotelial por redução da participação do NO na modulação endotelial. Isso ocorre devido a redução da liberação local de NO em anéis de aorta expostos ao cádmio em comparação com os controles. Porém, a expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>) não mostrou-se alterada, provavelmente devido ao tempo de exposição.

Diante disso, sabe-se que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumento da contração vascular. Com isso, o próximo passo desse estudo, foi avaliar a possível participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vascular alterada pela exposição ao cádmio.

#### 4.6 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Alguns autores associam o efeito tóxico do cádmio ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Bagchi et al., 1997; He et al., 2008; Liu et al., 2009; Manca et al., 1994). Sendo assim, para elucidar a maneira pela qual a exposição ao cádmio modificou a resposta contrátil à fenilefrina foi necessário entender a participação das espécies reativas de oxigênio nesse modelo experimental. Inicialmente analisou-se a participação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na resposta contrátil à fenilefrina.

Para avaliar a participação do  $O_2^{\bullet-}$  na resposta vascular a fenilefrina realizamos experimentos de reatividade vascular em anéis de aorta na presença do varredor de ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e também experimentos na presença do inibidor da NAD(P)H oxidase, Apocinina (APO, 0,3 mM). A NADPH oxidase é a principal fonte de  $O_2^{\bullet-}$ , é uma enzima composta por duas proteínas de membrana (gp 91 *phox* e a p22 *phox*) e três proteínas citosólicas (p67 *phox*, p47*phox* e p40 *phox* (Katsuyama, 2010).

A apocinina promoveu redução tanto na sensibilidade como na resposta máxima a fenilefrina nos segmentos arteriais de animais dos grupos controle e cádmio, todavia, quando comparados os efeitos da inibição da NADPH oxidase, por meio da dAUC, entre os animais dos dois grupos experimentais, nota-se efeito de maior magnitude nos animais do grupo cádmio (Figura 16, Tabela 3).

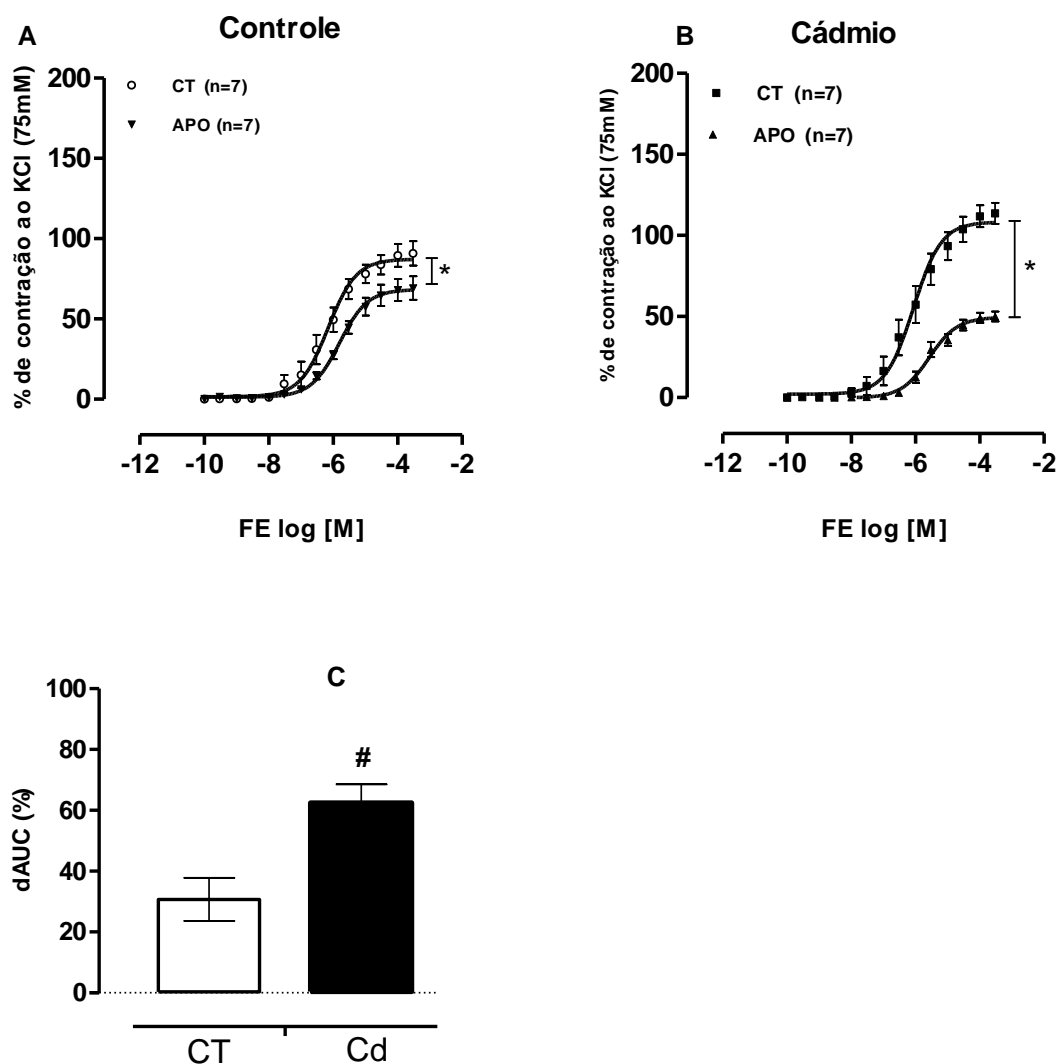
A superóxido dismutase é uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e é o principal antioxidante endógeno vascular (McCord & Fridovich, 1988). Assim, a utilização da SOD é uma maneira de avaliar a participação do ânion superóxido, mas com produção de  $H_2O_2$ , um produto também vasoativo. Em artérias do grupo controle a incubação com SOD

não alterou a resposta contrátil à fenilefrina, porém foi observada redução da resposta máxima à fenilefrina em anéis de aorta do grupo cádmio (Figura 17A e B).

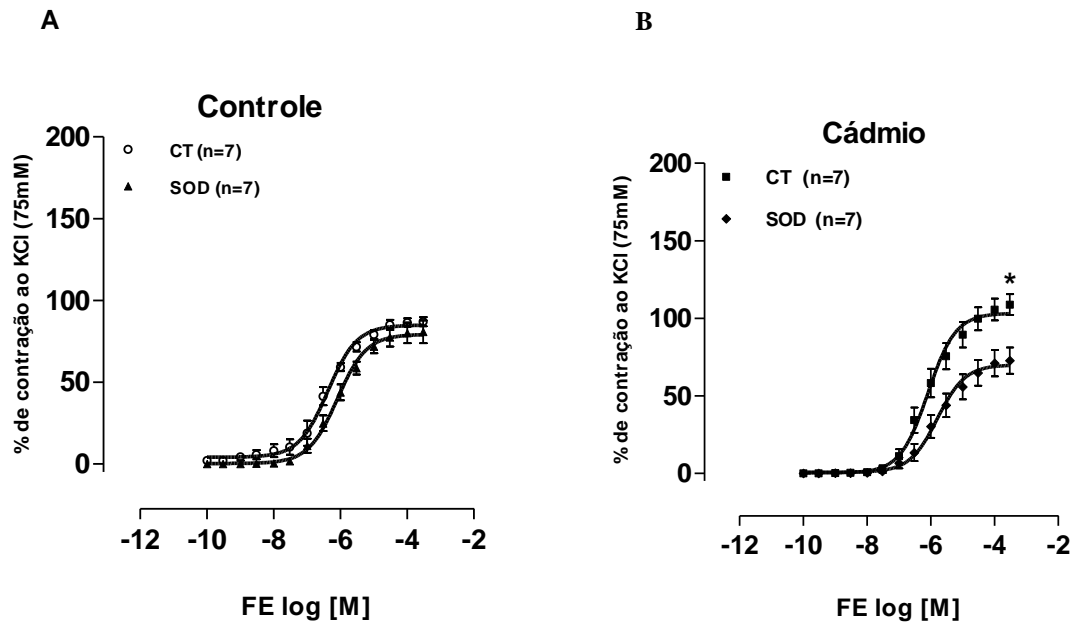
A participação do  $H_2O_2$  na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada em experimentos em que os anéis de aorta eram incubados com varredor do peróxido de hidrogênio, catalase (Cata, 1000 U/ml). A catalase promoveu redução na resposta máxima à fenilefrina nos segmentos arteriais de animais de ambos os grupos controle e cádmio, todavia, quando comparados os efeitos da catalase, através da dAUC, entre os animais dos dois grupos experimentais, nota-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 18 D).

Como descrito, a utilização da SOD é uma maneira de avaliar a participação do ânion superóxido, mas com produção de  $H_2O_2$ , um produto também vasoativo. Sendo assim, realizou-se a co-incubação SOD mais catalase buscando avaliar o efeito do anion superóxido isoladamente. O resultado obtido foi semelhante ao resultado utilizando somente a SOD (Figura 17 D).

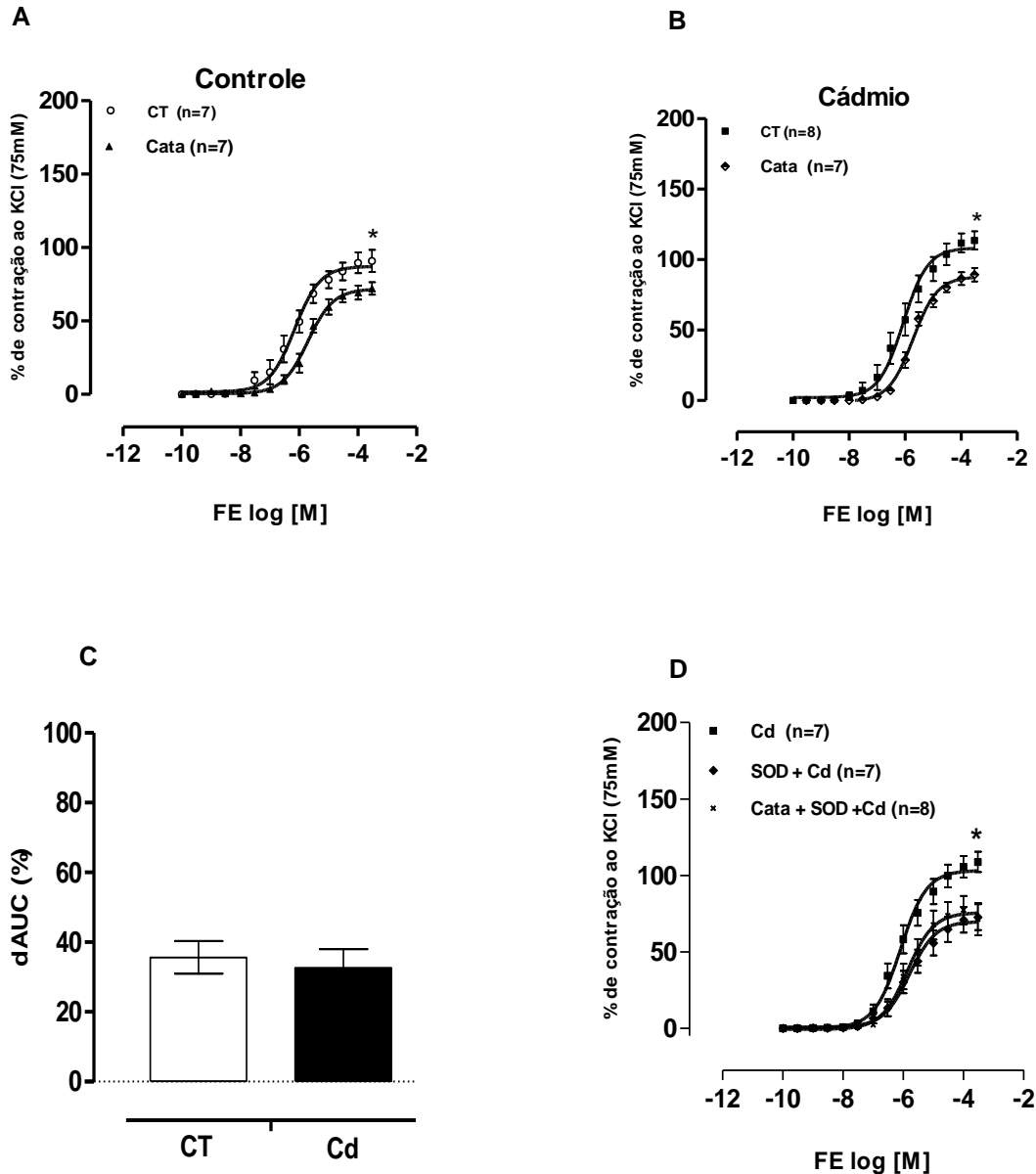
Esses resultados sugerem que na exposição aguda ao cádmio de anéis de aorta de ratos ocorre maior participação do  $O_2^{\bullet-}$ , via NADPH oxidase, na resposta contrátil a fenilefrina, sem haver participação do peróxido de hidrogênio.



**Figura 16:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina (APO, 0.3 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva da concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). (dAUC% Ct x Apo:  $-26,72 \pm 9,41$  vs Cd x apo + Cd:  $-62,47 \pm 6,13$ ). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAUC foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs APO. #  $P < 0,05$  controle vs cádmio.



**Figura 17:** Efeito do varredor do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio. Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs SOD.



**Figura 18:** Efeito da catalase (Cata, 1000 U/ml), varredor do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Em (D) a co-incubação SOD mais catalase no grupo cádmio. Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAUC foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs Cata e Cd VS Cata + SOD+Cd.  $P > 0,05$  controle vs cádmio.



**Tabela 3:** Efeito do inibidor da NADPH-oxidase, Apocinina (0.3 Mm) , do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e da Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre os valores de  $pD_2$  e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

	$pD_2$		$R_{m\acute{a}x}$ (%)	
	Controle	Cádmio	Controle	Cádmio
<b>Apocinina</b>				
Controle	$-6,17 \pm 0,16$	$-6,03 \pm 0,17$	$90,6 \pm 8,1$	$113,6 \pm 6,4\#$
Apocinina	$-5,86 \pm 0,07$	$-5,53 \pm 0,11^*$	$69,2 \pm 7,3^*$	$53,4 \pm 4,3^*$
<b>SOD</b>				
Controle	$-6,42 \pm 0,09$	$-6,08 \pm 0,18$	$86,9 \pm 2,7$	$108,8 \pm 6,4\#$
SOD	$-6,09 \pm 0,12$	$-5,75 \pm 0,15$	$80,7 \pm 6,9$	$72,7 \pm 8,4^*$
<b>Catalase</b>				
Controle	$-6,17 \pm 0,16$	$-6,03 \pm 0,17$	$90,8 \pm 7,5$	$113,6 \pm 6,4\#$
Catalase	$-5,77 \pm 0,11$	$-5,69 \pm 0,08$	$65,2 \pm 7,7^*$	$90,8 \pm 5,4^*$

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Teste t:  $*P < 0,05$  Curva Controle vs Curva + Fármaco.  $\#P < 0,05$  grupo controle vs grupo cádmio.

Em conjunto, os resultados até aqui apresentados indicam que o aumento da liberação de radicais livres envolve, especialmente, a NAD(P)H oxidase, a maior fonte de origem de ânion superóxido. Frente a isso, surgiu o seguinte questionamento: quais fatores poderiam estar aumentando a atividade da NAD(P)H oxidase após exposição ao cádmio? Seria, talvez, o próprio cádmio, ou algum fator

endotelial estimulado por esse metal, como por exemplo, os prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX) ou mesmo a angiotensina II? Para responder essas perguntas, a via dos prostanóides derivados da COX e o sistema renina-angiotensina foram avaliadas.

#### **4.7 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina**

Com o intuito de avaliar a influência dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio, foi realizada uma sequência de experimentos de reatividade vascular com: indometacina (inibidor não seletivo da COX); NS 398 (inibidor seletivo da COX 2); SQ 29,548 (antagonista do receptor TP); SC 19,220 (antagonista do receptor EP<sub>1</sub>) e furegrelato (inibidor da síntese do TXA<sub>2</sub>).

O inibidor não seletivo da COX, indometacina (10 µM) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina no grupo controle, porém foi observada redução da resposta máxima e da sensibilidade à fenilefrina em anéis de aorta do grupo cádmio (Figura 19, Tabela 4). Estes resultados sugerem que nos animais do grupo cádmio há uma maior participação dos prostanóides vasoconstritores derivados da COX na resposta a fenilefrina.

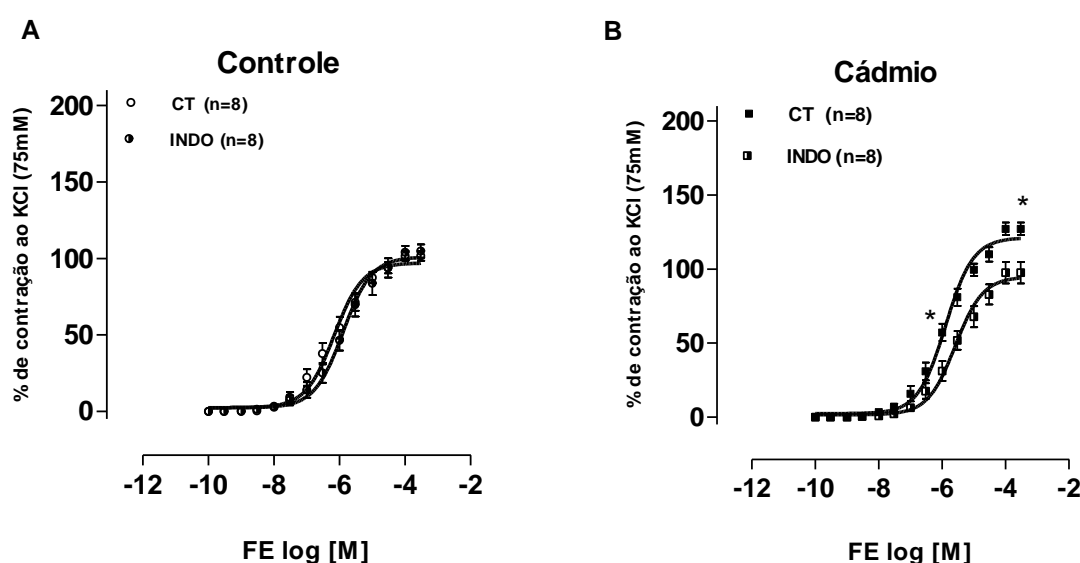
Após verificar que a exposição ao cádmio aumenta a participação dos prostanóides contráteis derivados da COX na resposta vascular à fenilefrina estudamos se, estes prostanóides, são derivados da COX-2. Com o objetivo de avaliar esta hipótese anéis de aorta foi incubados com o inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 µM). Este fármaco promoveu redução da resposta máxima à fenilefrina somente em animais do grupo cádmio (Figura 20, Tabela 4).

Diante das evidências de maior participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta dos ratos expostos ao cádmio foi investigado se estes prostanóides agem através da ativação dos receptores TP ou EP<sub>1</sub>. Para isso foram realizados experimentos de reatividade vascular a fenilefrina em anéis de aorta incubados com o antagonista do receptor TP, o SQ 29,548 (1 µM) e experimentos com artérias pré-incubadas com o SC 19,220 (10 µM), antagonista do receptor EP<sub>1</sub>. Estes fármacos reduziram a resposta

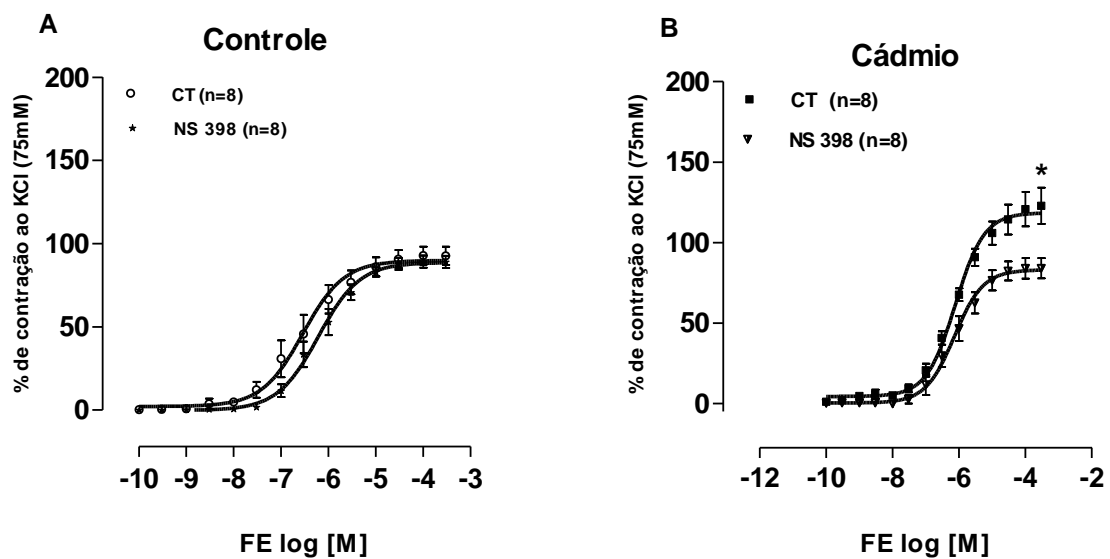
máxima à fenilefrina somente nos segmentos arteriais de ratos do grupo cádmio (Figuras 21 e 22, Tabela 4).

Por fim, para verificar se a exposição ao cádmio promove aumento da participação do tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) na resposta contrátil a fenilefrina, anéis de aorta de ratos dos grupos controle e cádmio foram incubados com furegrelato (10  $\mu$ M), inibidor da sintase do TXA<sub>2</sub>. O furegrelato reduziu a resposta contrátil à fenilefrina somente nos anéis de aorta de ratos expostos ao cádmio (Figura 23, Tabela 4).

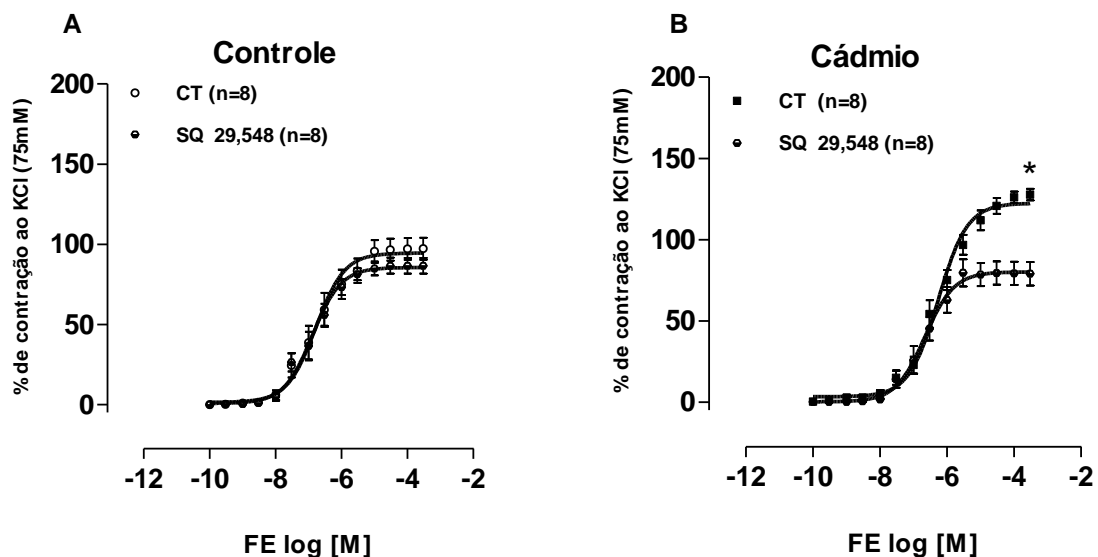
Juntos, esses resultados sugerem maior participação dos prostanóides derivados da COX-2, em especial do TXA<sub>2</sub>, na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta de ratos expostos ao cádmio. Além disso, estes prostanóides parecem agir principalmente por meio da ativação dos receptores TP e EP<sub>1</sub>.



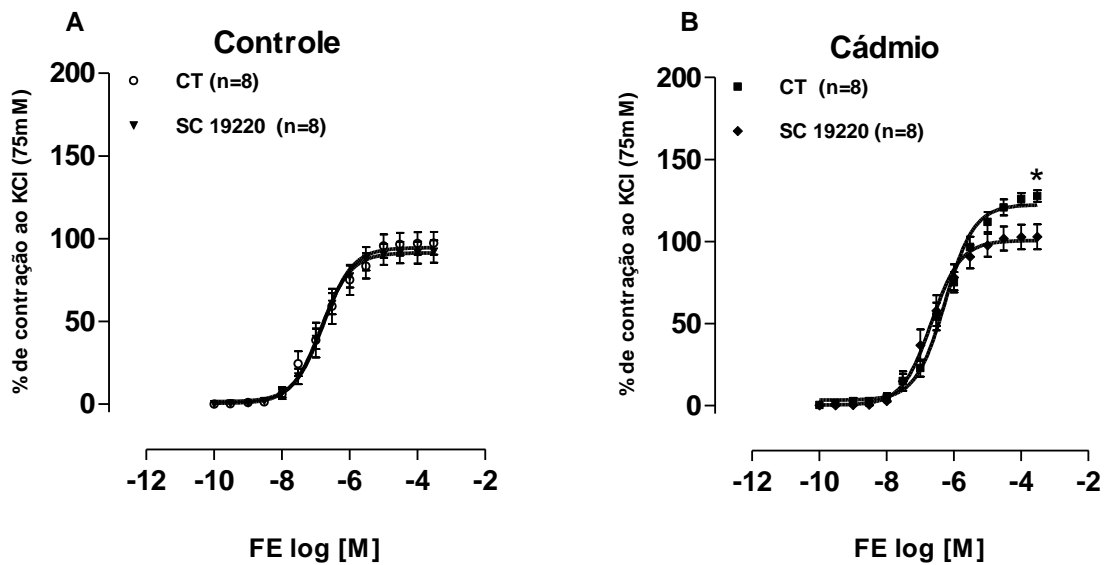
**Figura 19:** Efeito do inibidor não específico da COX, indometacina (INDO, 10  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs INDO.



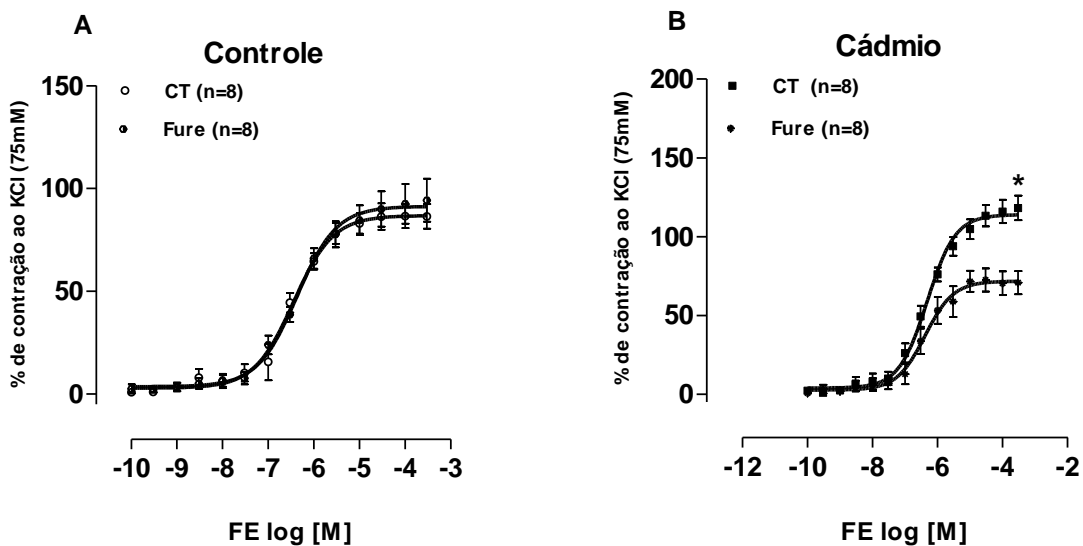
**Figura 20:** Efeito do inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Os resultados, média  $\pm$  EPM, estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $p < 0,05$  CT vs NS 398.



**Figura 21:** Efeito do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Os resultados, média  $\pm$  EPM, da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs SQ 29,548.



**Figura 22:** Efeito do antagonista do receptor  $EP_1$ , SC 19,220 (10  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos controle (A) e cádmio (B). Os resultados, média  $\pm$  EPM, da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs SC 19,220.



**Figura 23:** Efeito inibidor da sintase do  $TXA_2$ , furegrelato (10  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). Os resultados, média  $\pm$  EPM, da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  CT vs Fure.

**Tabela 4:** Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (10  $\mu$ M), do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1  $\mu$ M), do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1  $\mu$ M), do antagonista do receptor EP<sub>1</sub>, SC 19,220 (10  $\mu$ M) e do inibidor da sintase do TXA<sub>2</sub>, furegrelato (10  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos controle e cádmio.

	pD <sub>2</sub>		R <sub>máx</sub> (%)	
	Controle	Cádmio	Controle	Cádmio
<b>Indometacina</b>				
Controle	-6,79 $\pm$ 0,09	-6,70 $\pm$ 0,07	88,4 $\pm$ 3,6	106,7 $\pm$ 3,5#
Indometacina	-6,77 $\pm$ 0,07	-6,71 $\pm$ 0,10	73,9 $\pm$ 3,4*	76,7 $\pm$ 5,8*
<b>NS 398</b>				
Controle	-6,53 $\pm$ 0,23	-6,17 $\pm$ 0,13	92,7 $\pm$ 5,4	122,9 $\pm$ 11,3#
NS 398	-6,20 $\pm$ 0,15	-6,15 $\pm$ 0,15	88,9 $\pm$ 3,6	84,0 $\pm$ 6,3*
<b>SQ 29,548</b>				
Controle	-6,74 $\pm$ 0,20	-6,28 $\pm$ 0,11	97,2 $\pm$ 6,8	127,7 $\pm$ 3,6#
SQ 29,548	-6,87 $\pm$ 0,17	-6,63 $\pm$ 0,12	86,5 $\pm$ 4,8	79,0 $\pm$ 7,2*
<b>SC 19,220</b>				
Controle	-6,74 $\pm$ 0,20	-6,28 $\pm$ 0,11	97,2 $\pm$ 6,8	127,7 $\pm$ 3,6#
SC 19,220	-6,83 $\pm$ 0,11	-6,64 $\pm$ 0,17	92,1 $\pm$ 6,8	102,9 $\pm$ 7,6*
<b>Furegrelato</b>				
Controle	-6,48 $\pm$ 0,10	-6,36 $\pm$ 0,12	86,6 $\pm$ 6,1	118,2 $\pm$ 7,8#
Furegrelato	-6,38 $\pm$ 0,09	-6,33 $\pm$ 0,16	94,2 $\pm$ 10,4	70,8 $\pm$ 7,3*

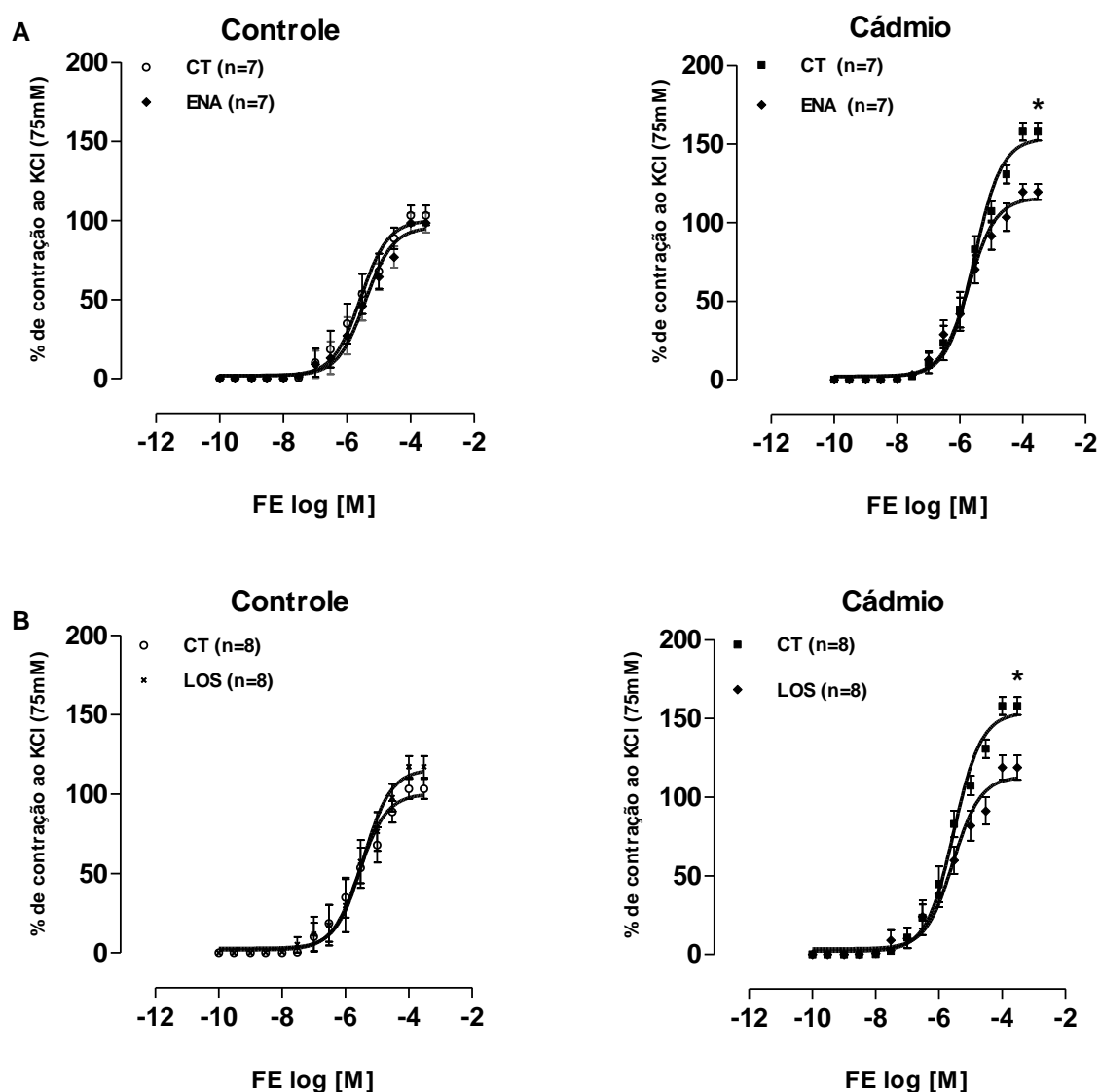
Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Teste t: \* $P < 0,01$  Curva Controle vs Curva + Fármaco. #  $P < 0,05$  grupo Controle vs grupo cádmio.

#### **4.8 Análise da participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina**

Para investigar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina em segmentos de aorta de ratos expostos ao cádmio, realizamos experimentos de reatividade vascular na presença do inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril ( $10\mu\text{M}$ ) e também experimentos onde os anéis de aorta eram pré-incubados com o antagonista dos receptores  $\text{AT}_1$ , Losartan ( $10\mu\text{M}$ ). O Losartan reduziu a resposta máxima a fenilefrina somente nos segmentos arteriais dos animais do grupo cádmio (Figura 24A, Tabela 5). Similar a resposta ao Losartan a inibição da enzima conversora da angiotensina reduziu a resposta máxima à fenilefrina apenas nos segmentos arteriais dos animais do grupo cádmio (Figura 24B, Tabela 5).

Estes resultados sugerem que a exposição aguda ao cádmio aumenta a participação da angiotensina II na resposta contrátil a fenilefrina. Além disso, foi realizado o estudo da expressão protéica dos receptores angiotensinoginérgicos  $\text{AT}_1$ .



**Figura 24:** Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Enalapril (10  $\mu$ M) e do antagonista do receptor AT<sub>1</sub>, Losartan (10  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e cádmio. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste t de Student \*  $P < 0,05$ .



**Tabela 5:** Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Enalapril (10 $\mu$ M) e do antagonista do receptor AT<sub>1</sub>, Losartan (10 $\mu$ M) sobre os valores de pD<sub>2</sub> e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Cádmio.

	pD <sub>2</sub>		R <sub>máx</sub> (%)	
	Controle	Cádmio	Controle	Cádmio
<b>Enalapril</b>				
Controle	-6,81 $\pm$ 0,08	-6,72 $\pm$ 0,07	103,2 $\pm$ 6,2	157,9 $\pm$ 5,6#
Enalapril	-6,73 $\pm$ 0,08	-6,64 $\pm$ 0,09	98,6 $\pm$ 6,1	119,53 $\pm$ 5,0*
<b>Losartan</b>				
Controle	-6,59 $\pm$ 0,08	-6,83 $\pm$ 0,03	103,2 $\pm$ 6,2	157,9 $\pm$ 5,6#
Losartan	-6,51 $\pm$ 0,08	-6,65 $\pm$ 0,03	113,3 $\pm$ 7,0	111,4 $\pm$ 8,2*

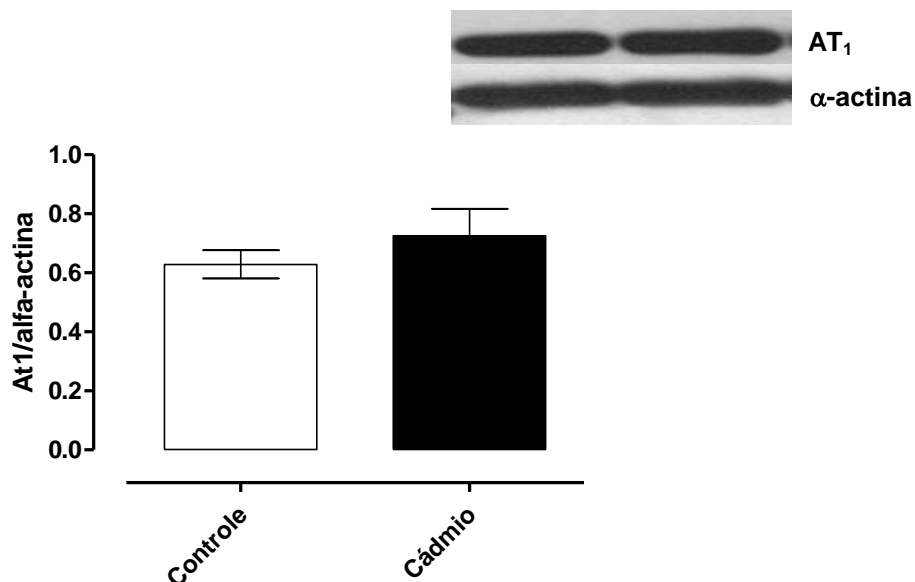
Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Teste t: \*P<0,01 Curva Controle vs Curva + Fármaco. # P<0,05 grupo Controle vs grupo cádmio.

.

#### 4.9 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérico AT<sub>1</sub>

Através da técnica de Western Blot a expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> foi detectada nos segmentos de aorta torácica dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica foi semelhante nas artérias dos animais dos grupos Controle e Cádmio (Figura 25).



**Figura 25:** Resultados da expressão protéica do receptor angiotensinoginérico AT<sub>1</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmio (n = 7). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>1</sub> e da α-actina. Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT<sub>1</sub> e da α-actina. Teste t: P>0,05.

## V DISCUSSÃO

O cádmio é um metal altamente tóxico presente na crosta terrestre, encontra-se na forma de mineral combinado com outros elementos, tais como oxigênio, cloro, ou enxofre. Humanos e animais são expostos ao cádmio através de uma variedade de vias, incluindo a contaminação industrial, alimentos e o fumo do tabaco (Nation *et al.*, 1987; Hudecova & Ginter, 1992). O cádmio apresenta sérios riscos para a saúde humana e afeta vários órgãos e sistemas (ATSDR, 2008). A exposição crônica a este metal pode causar efeitos adversos aos rins, fígado, pulmões, pâncreas, testículos, placenta e ossos.

O cádmio também é um fator de risco reconhecido para as doenças cardiovasculares em humanos (Mead *et al.*, 1996; Navas-Acien *et al.*, 2004; Tellez-Plaza *et al.*, 2008), sendo o endotélio vascular o principal alvo para a toxicidade ao cádmio (Nolan & Shaikh, 1986; Prozialeck, 2006). Este efeito parece envolver, pelo menos em parte, uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (Gokalp *et al.*, 2009). Recentemente, estudo em nosso laboratório demonstrou que a exposição crônica ao cádmio reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, provavelmente, devido ao aumento do estresse oxidativo (Almenara *et al.*, 2013). Somado a isso, estudos indicam uma associação entre os níveis de cádmio no sangue e na urina e danos cardiovasculares (Wolf & Baynes, 2007; Mitra *et al.*, 2011).

O cádmio é um metal pesado, classificado como número 7 na lista de prioridades dos 275 materiais perigosos (ATSDR, 2008), é um dos produtos químicos que se encontra entre as dez principais preocupações em saúde pública (WHO, 2010).

Humanos e animais são expostos ao cádmio através de uma variedade de vias, incluindo a contaminação industrial, fontes de alimentos e tabaco (Paoliello, 2001). A exposição humana ocorre, principalmente, pelo consumo de alimentos contaminados, inalação ativa e passiva da fumaça do cigarro, e contaminação ocupacional de trabalhadores na indústria de metais não ferrosos (WHO, 2010). A exposição diária estimada de cádmio em homens adultos não fumantes e mulheres que vivem nos Estados Unidos são 0.35 e 0.30  $\mu\text{g Cd/kg/dia}$ , respectivamente. Sendo a principal via de exposição através da inalação de poeiras e fumos ou ingestão acidental devido às mãos contaminadas, alimentos ou cigarros (ATSDR, 2008).

A ingestão semanal tolerável (PTWI) para o cádmio é de 7  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal, o que se traduz em 70  $\mu\text{g/dia}$  para uma pessoa que pesa 70 kg. No entanto, o tabagismo aumenta de maneira exacerbada a exposição ao cádmio devido ao acúmulo natural de cádmio nas folhas de tabaco (Paoliello, 2001). Este metal é liberado, juntamente com os demais compostos, no processo de combustão das folhas do tabaco. Estima-se que fumantes são expostos a cerca de 1,7  $\mu\text{g}$  de cádmio por cigarro, desses, aproximadamente 10% é inalado durante a combustão. O nível médio sanguíneo de cádmio para fumantes tem sido relatado como sendo de 1,58  $\mu\text{g} / \text{L}$ , em comparação com a média da estimativa da população adulta Americana de 0,47  $\mu\text{g} / \text{L}$  (ATSDR, 2008).

Após a inalação, o cádmio, presente na fumaça do cigarro, pode depositar-se em vários tecidos, inclusive, na aorta, tendo uma vida média de eliminação de 10 a 30 anos (Lazo & Pitt, 1995). A lenta eliminação de cádmio pode alterar a relação entre o teor de cádmio aórtico e anos/maço consumidos. Abu-Hayyeh *et al.*, (2001) demonstraram que o teor de cádmio em aortas de humanos aumenta em

proporção direta com os anos/maço de cigarros fumados, com o acúmulo seletivo na camada média. A concentração média de cádmio acumulada na camada média de aorta de humanos, demonstrada nesse trabalho, foi de 7  $\mu\text{mol/L}$ . Essa concentração de cádmio foi suficiente para reduzir significativamente a síntese de colágeno nessas células.

Embora seja crescente o número de trabalhos que estudam os efeitos tóxicos do cádmio sobre o sistema cardiovascular, ainda não estão claros os mecanismos do efeito vascular, da exposição ao cádmio, e as mudanças na síntese ou liberação de agentes vasoativos que este metal pode causar.

A disfunção endotelial caracterizada pela deficiência na produção e/ou biodisponibilidade do óxido nítrico em resposta a sinalização normal é uma característica observada em anormalidade no sistema vascular, e é um componente crítico no desenvolvimento da aterosclerose (Calles-Escandon & Cipolla, 2001). É importante ressaltar que o estresse oxidativo induzido pelo cádmio pode aumentar a peroxidação lipídica (Manca *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008) que, por sua vez, pode induzir a aterosclerose (Meijer *et al.*, 1996; ATSDR, 2008). Portanto, o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial após exposição ao cádmio possuem um grande potencial para melhor esclarecimentos das complicações cardiovasculares em intoxicações com o cádmio.

Sendo assim, a importância desse estudo reside no fato de avaliar a exposição aguda ao cádmio (10  $\mu\text{M}$ ) buscando esclarecer os mecanismos tóxicos sob o sistema vascular, em especial, sobre a aorta, relacionando-os com alterações endoteliais, produção de radicais livres, alteração da atividade de enzimas antioxidantes, do sistema renina-angiotensina e da via da ciclooxygenase. E sem

dúvidas conseguimos avançar no conhecimento dos efeitos e dos mecanismos pelos quais o cádmio exerce efeito tóxico sobre vaso de condutância de ratos.

O presente estudo demonstrou que a exposição aguda ao cádmio, em vasos de condutância, causa disfunção endotelial por diminuição da modulação endotelial via NO levando ao aumento da resposta vasoconstrictora a fenilefrina. Tal disfunção foi caracterizada pelo aumento da produção de radicais livres, principalmente ao aumento da produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pela NADPH oxidase. Somado a isso, os efeitos vasoconstrictores promovidos pelo cádmio envolvem: o sistema renina angiotensina local e aumento da produção de prostanóides vasoconstrictores pela COX-2 como o tromboxano  $A_2$  e prostaglandina  $H_2$  contribuindo para o aumento dos radicais livres. Assim, este trabalho demonstra os mecanismos vasculares, à exposição aguda ao cádmio como disfunção endotelial provavelmente por aumento da produção local de angiotensina II e aumento da atividade da COX-2 e NADPH oxidase, que juntos geram aumento da produção de radicais livres, e consequente diminuição da biodisponibilidade de NO.

Inicialmente foi verificada a resposta à fenilefrina em aorta de ratos dos grupos controle e cádmio e foi observada resposta contrátil concentração-dependente maior nos animais expostos ao cádmio. Esses resultados corroboram com Tzotzes *et al.*, (2007) que observaram que a administração aguda de cádmio (2mg/kg) aumentou a vasoconstrição em anéis de aorta de ratos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Takahashi *et al.*, (2004), também avaliando aorta de ratos, observaram que em aortas pré-tratados com cádmio, 10  $\mu$ M, “*in vitro*”, a resposta contrátil à fenilefrina foi significativamente mais elevada quando comparadas ao controle.

Dando prosseguimento ao estudo, para melhor entendimento do efeito do cádmio sobre a reatividade de aorta de ratos foi investigado, se a exposição ao cádmio alterava a participação do endotélio e do óxido nítrico no controle do tônus vascular.

As células endoteliais desempenham importante papel no controle do tônus vascular através da liberação de substâncias vasoativas como o óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, endotelina, angiotensina II e prostanóides derivados da via da ciclooxygenase-2, entre outros (Harrison *et al.*, 1994; Vane & Botting, 1993; Vane *et al.*, 1995;). Sabe-se que o cádmio é capaz de induzir hipertensão. Independentemente, acredita-se que a ocorrência de alterações da função endotelial levando a uma disfunção endotelial, é um marco nas das doenças cardiovasculares (Silva *et al.*, 2012). Isso, fez com que fossem desenvolvidos experimentos para verificar a ocorrência de disfunção endotelial.

A disfunção endotelial é definida como o desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs), associados com o aumento da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da capacidade antioxidante caracterizado como estresse oxidativo (Silva *et al.*, 2012).

Como o termo disfunção endotelial é utilizado quando há prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio por redução da ação do óxido nítrico (Cai & Harrison, 2000), foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina. A acetilcolina promove relaxamento dependente do endotélio, em segmentos de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina e expostos ao cádmio. Além disso, avaliou-se o relaxamento independente do endotélio através da curva concentração- resposta ao nitroprussiato de sódio.

A acetilcolina provocou resposta vasodilatadora, concentração-dependente, nos segmentos arteriais de animais dos grupos controle e cádmio. No entanto, o relaxamento não se mostrou significativamente diferente entre os animais do grupo cádmio quando comparados ao grupo controle, evidenciando que o cádmio nessa concentração e tempo de exposição não prejudicou o relaxamento dependente do endotélio. De maneira semelhante, os resultados obtidos na curva com o nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico, não se mostrou significativamente diferente entre os animais do grupo cádmio, evidenciando que o cádmio nessa concentração e tempo de exposição não prejudicou o relaxamento independente do endotélio.

A avaliação independente do endotélio vascular corrobora com dados da literatura que demonstram que apesar das diferenças entre os modelos experimentais a exposição ao cádmio não altera a resposta à curva concentração resposta ao nitroprussiato de sódio (Bilgen *et al.*, 2003 , Gökalp *et al.*, 2009 e Yooan *et al.*, 2008).

Além disso, Tzotzes *et al.*, (2007) corroborando com os resultados apresentados, não notaram alteração na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, após administração aguda de cádmio (2mg/kg). Em contrapartida, contrário aos nossos achados Gökalp *et al.*, (2009) demonstraram que em com hipertensão induzida por cádmio (administração intraperitoneal de cádmio 1mg/Kg/dia durante 15 dias) o relaxamento dependente do endotélio em resposta acetilcolina foi notavelmente atenuado em anéis de aortas. Somado a isso, Yooan *et al.*, (2008) utilizando ratos em um modelo de exposição ao cádmio de 10 e 50 ppm na água de beber, também demonstrou atenuação no relaxamento dependente do endotélio em resposta à acetilcolina. Portanto, os divergentes achados na literatura



devem-se, provavelmente, aos diferentes modelos experimentais utilizados, em especial no que se refere às variadas concentrações e aos diferentes tempos de exposição ao cádmio.

Mesmo não tendo sido observadas alterações significantes no relaxamento dependente do endotélio, após exposição ao cádmio, era necessário investigar o efeito deste tipo de exposição sobre a disfunção endotelial, pois o cádmio é associado ao maior risco de desenvolvimento de alterações cardiovasculares. Sendo assim, diante da divergência entre os dados da literatura, apesar dos resultados inicialmente, neste modelo experimental, não apresentarem aparente disfunção endotelial frente à resposta vasodilatadora à acetilcolina, buscou-se avaliar a participação do endotélio na resposta vascular a fenilefrina através da remoção mecânica do endotélio.

A ausência do endotélio promoveu aumento significativo na sensibilidade e na resposta máxima à fenilefrina nos segmentos aórticos de animais dos grupos controle e cádmio. Porém, quando comparados os resultados do efeito da ausência do endotélio, por meio da dAUC, entre os animais de ambos os grupos experimentais foi observado efeito de menor magnitude nos animais do grupo cádmio, sugerindo que a exposição ao cádmio reduz a participação do endotélio na resposta contrátil a fenilefrina. Logo, constatou-se que a exposição ao cádmio, leva ao aumento da reatividade vascular à fenilefrina e a concomitante redução da modulação endotelial.

Os resultados apresentados até o momento nos demonstram que a exposição aguda ao cádmio promove alterações na resposta constritora à fenilefrina em anéis de aorta de ratos e que esses efeitos são dependentes do endotélio vascular. Adicionalmente, como a modulação endotelial apresentou-se menor no grupo

cádmio, os resultados apresentados sugerem que esse metal pode reduzir a liberação de um fator vasodilatador e/ou aumentar a liberação de um vasoconstrictor de maneira dependente do endotélio. Portanto, o próximo passo do presente estudo foi avaliar as possíveis vias envolvidas nesses efeitos a partir de análises funcionais e bioquímicas.

Ao considerar que a disfunção endotelial pode ser causada pela redução da síntese ou da biodisponibilidade do óxido nítrico (Triggle *et al.*, 2003) e que o óxido nítrico é um dos mais importantes produtos liberados pelo endotélio vascular (Maturana *et al.*, 2007) deu-se prosseguimento ao estudo, realizando uma curva concentração-resposta a fenilefrina na presença de L-NAME, inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico. O L-NAME foi utilizado para investigar o papel do NO nos efeitos produzidos por cádmio sobre as respostas contrácteis induzidas por fenilefrina.

O resultado foi semelhante ao observado nos experimentos em que o endotélio foi removido. Como resultado, o L-NAME provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nas artérias de animais dos grupos controle e cádmio. Porém, os valores da dAUC demonstram que a participação do NO na resposta contrátil a fenilefrina está reduzida em anéis de aorta expostos ao cádmio.

Estes resultados indicam que a incubação com cádmio, na concentração de 10µM, em aorta de ratos, reduz a biodisponibilidade de NO endotelial induzida por modulação das respostas vasoconstritoras. Adicionalmente, foi realizada a análise da liberação local de NO na condição basal, estimulada e na presença de triton. Corroborando com o dado funcional apresentado para o L-NAME, análise da liberação local de NO demonstrou-se reduzida no grupo cádmio. Além disso, sob

condições basais, foram realizadas a expressão proteica da isoformas eNOS e p-eNOS<sup>ser1177</sup>. Entretanto a expressão proteica não se mostrou alterada entre os grupos avaliados.

Dados na literatura denotam que a exposição ao cádmio provoca estresse oxidativo intracelular (Carageorgiou *et al.*, 2005), resultando em uma diminuição na formação de NO (Buzard & Kasprzak, 2000). Isto pode ser enfatizado por achados na literatura que demonstram a redução da formação de óxido nítrico através da inibição da nNOS (Tzotzes *et al.*, 2006) e da diminuição da expressão da eNOS (Gökalp *et al.*, 2009 e Yoopan *et al.* 2008). Em contrapartida, Takahashi *et al.*, (2004) em modelo semelhante ao apresentado em nosso estudo (exposição “*in vitro*” à 10µM de cádmio por 24 horas) observou que o cádmio promoveu aumento na expressão da iNOS e da eNOS em aorta de ratos. Em adição, a redução de óxido nítrico no soro de ratos expostos ao cádmio foram observados por Martynowicz *et al.*, (2004) e Skoczynska & Martynowicz (2005). Novamente é notória a divergência entre os dados da literatura, provavelmente, pela alternância nos modelos experimentais e nas doses utilizadas.

Nossos resultados referentes à avaliação na participação do NO na resposta alterada após a exposição ao cádmio, juntos, mostram a redução da participação do NO na modulação endotelial devido à redução da liberação local desse fator relaxante em anéis de aorta expostos ao cádmio em comparação aos controles. Entretanto, a expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) e da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>) não se mostrou alterada, provavelmente devido ao curto tempo de exposição a esse metal.

Dando prosseguimento às análises, sabe-se que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio é um dos principais fatores que leva à redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumenta a contração do músculo liso vascular. Com isso, buscou-se avaliar a possível participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vascular alterada pela exposição ao cádmio.

No sistema cardiovascular, as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel crucial no controle da função endotelial e do tônus vascular. Fisiologicamente, os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) em especial: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) poderiam ser prejudicados na exposição ao cádmio; levando a diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar NO.

Apesar dos inúmeros dados na literatura referentes aos efeitos tóxicos após a exposição ao cádmio, os alvos moleculares envolvidos na toxicidade aguda a esse metal permanecem em grande parte não identificados. Entre os mecanismos mais descritos estão a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequentemente ao aumento de radicais livres (He *et al.*, 2008; Liu *et al.*; 2009). Como o cádmio é um metal redox-estável, o estresse oxidativo gerado por ele ocorre através de mecanismos indiretos. Entre esses mecanismos pode-se destacar a depleção de enzimas antioxidantes, especificamente a glutathione peroxidase e superóxido dismutase, resultando em aumento da produção de ROS como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais livres (Stohs *et al.*; 2001). Entretanto, não encontramos dados na literatura que demonstrassem os possíveis efeitos sobre a reatividade vascular em aorta de ratos após a exposição aguda ao cádmio.

Para elucidar a maneira pela qual a exposição ao cádmio modificou a resposta contrátil à fenilefrina foi necessário entender a participação das espécies

reativas de oxigênio nesse modelo experimental. Para isso, inicialmente analisou-se a participação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na resposta contrátil à fenilefrina.

A participação do  $O_2^{\bullet-}$  na resposta vascular a fenilefrina foi verificada com varredor de ânion superóxido, SOD. Já a participação da NADPH oxidase, com um inibidor da mesma, apocinina, e a participação do  $H_2O_2$ , avaliou-se com catalase, varredor do peróxido de hidrogênio. Como resultado: apocinina promoveu efeito de maior magnitude nos animais do grupo cádmio e nem a SOD nem a catalase alteraram a resposta contrátil à fenilefrina após exposição a essas concentrações de cádmio.

Esses resultados sugerem que na exposição aguda ao cádmio em anéis de aorta de ratos ocorre maior participação do  $O_2^{\bullet-}$ , gerados pela NADPH oxidase, na resposta contrátil a fenilefrina, sem haver participação do peróxido de hidrogênio. Sendo assim, é possível sugerir que o aumento da reatividade vascular à fenilefrina induzida pelo cádmio foi causada por um aumento da liberação de ROS, resultando em redução da biodisponibilidade de NO.

O principal fator que contribui para a redução de biodisponibilidade do NO é o aumento de ROS, em especial  $O_2^{\bullet-}$ , que ao interagir com NO forma peróxido de nitrito, consumindo o óxido nítrico e diminuindo assim a biodisponibilidade do mesmo e, como consequência, ocorre diminuição do relaxamento do músculo liso (Beckman & Koppenol, 1996).

Assim, pode-se sugerir nesse estudo que a redução da biodisponibilidade induzida por cádmio pode estar relacionado ao aumento dos níveis de ROS promovendo uma disfunção endotelial.

No processo de disfunção endotelial as células sofrem danos que podem modificar a expressão ou atividade das substâncias produzidas e liberadas pelo endotélio (Goligorsky, 2005). Os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase são algumas das substâncias liberadas pelas células endoteliais que desempenham importante função na regulação do tônus vascular e participam das respostas à agressão vascular (Alvarez *et al.*, 2005 e 2007). Estudos demonstram que prostanóides derivados da via da COX-2 estão associados ao desenvolvimento de doenças como hipertensão e aterosclerose (Adeagbo *et al.*, 2005; Alfranca *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2005; Antman *et al.*, 2005), e parecem contribuir para o aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina observadas em modelos de hipertensão e envelhecimento (Álvarez *et al.*, 2005; Widlansky *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2009; Zerrouk *et al.*, 1998). Como os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase estão diretamente envolvidos nas respostas vasculares, foi investigado, se as alterações vasculares encontradas neste modelo experimental de exposição ao cádmio estão associadas aos prostanóides derivados da via da COX.

Para analisar esta participação dos prostanóides foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde foram utilizados: indometacina (inibidor não seletivo da COX); NS 398 (inibidor seletivo da COX-2); SQ 29,548 (antagonista do receptor TP); SC 19,220 (antagonista do receptor EP<sub>1</sub>) e furegrelato (inibidor da síntese do TXA<sub>2</sub>).

A indometacina provocou redução na resposta contrátil à fenilefrina, que foi maior nas artérias de anéis de aorta expostos ao cádmio, sugerindo participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase na maior resposta a fenilefrina.

Efeito semelhante foi demonstrado em diferentes modelos experimentais (Bilgen I *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2002 ; Skoczyńska *et al.*, 2001), por exemplo,

Skoczyńska *et al.*, (2001) utilizando um inibidor da síntese de prostaglandinas, cetoprofeno, em artéria mesentéricas de ratos, após exposição ao cádmio (Cd 5 mg/Kg), uma vez por semana por um período de 7 semanas, demonstrou a participação dos prostanóides na resposta dessas artérias à noradrenalina em animais expostos ao metal. Entretanto, novamente não foi encontrado na literatura trabalho que tenha sido realizado mostrando a possível participação dos prostanóides em animais expostos ao cádmio em modelo experimental similar ao apresentado nessa pesquisa.

Sabendo da existência de duas isoformas da ciclooxigenase, a COX-1, isoforma constitutiva, e a COX-2, isoforma induzida, que são responsáveis pela produção dos prostanóides, era necessário esclarecer se os prostanóides que promovem maior resposta contrátil a fenilefrina eram derivados da COX-1 ou da COX-2 ou de ambas. Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina em segmentos de aorta incubados com inibidor específico da COX-2, o NS 398. Nesse experimento, observou-se que na presença do NS 398 ocorreu redução da resposta contrátil a fenilefrina somente na aorta dos animais do grupo cádmio, indicando que os prostanóides que promovem maior resposta contrátil a fenilefrina nos animais do grupo exposto ao cádmio são derivados da via da COX-2.

Não foram encontradas publicações que tivessem relacionado a exposição ao cádmio com maior participação de prostanóides derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina. Entretanto, Olszowski *et al.*, (2012) realizaram uma revisão sobre o efeito de cádmio sobre os mediadores e marcadores inflamatórios, entre eles a expressão de COX-2 (Alvarez *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2002; Figueiredo-Pereira *et al.*, 2002; Kundu *et al.*, 2009; Lee & Lim, 2011; Miyahara *et al.*, 2001;

Ramirez & Gimenez, 2003; Rockwell *et al.*, 2004; Seok *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2003).

Corroborando com nossos dados funcionais Lee & Lim, (2011) em estudo de células expostas a 10  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 24 horas exibiu significativamente maior expressão de COX-2 em comparação ao controle. Somado a isso, Rockwell *et al.*, (2004) usando células de camundongo HT4 expostas a 15  $\mu\text{M}$  de cádmio por 24 horas, também demonstram que o cádmio aumentou significativamente a expressão da proteína COX-2.

Sabendo-se que vários prostanóides contráteis são derivados da via da COX-2 era importante descobrir quais destes prostanóides participavam desta resposta aumentada a fenilefrina nos ratos expostos ao cádmio. Considerando que 5 diferentes prostanóides ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{TXA}_2$ ) são derivados da via da COX-2, foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde artérias foram incubadas com SQ 29,548, antagonista do receptor TP, ou SC 19,220, antagonista do receptor EP1, ou com Furegrelato, inibidor da sintase do  $\text{TXA}_2$ . Estes experimentos apresentaram resultado semelhante, sendo observada redução da resposta à fenilefrina somente nos segmentos de aorta dos ratos do grupo cádmio.

Considerando que os receptores TP e  $\text{EP}_1$  são estimulados pelos prostanóides  $\text{TXA}_2$  e  $\text{PGE}_2$  e o furegrelato inibe a sintase específica do  $\text{TXA}_2$  estes resultados sugerem que os mecanismos pelos quais o cádmio promove alteração vascular neste modelo animal envolvem a participação do  $\text{TXA}_2$  e da  $\text{PGE}_2$ . Novamente, não encontramos publicações que tivessem relacionado à exposição ao cádmio com maior participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina. Juntos esses resultados indicam que a alteração vascular observada neste modelo experimental deve-se, mesmo que parcialmente, a maior



participação da COX-2, por aumento na produção dos prostanóides TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, e na maior participação destes na resposta vascular a fenilefrina.

Além desses resultados e conforme já descrito na literatura, a angiotensina II pode induzir a expressão de COX-2 (Álvarez *et al.*, 2007; Beltran *et al.*, 2009) e, além disso, aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (Wolf, 2000), reduzir a biodisponibilidade do NO e provocar disfunção endotelial (Doughan *et al.*, 2008). Assim, a angiotensina II, quando em excesso pode promover alterações semelhantes às observadas no modelo animal deste estudo. Em consonância, o aumento da atividade do sistema renina angiotensina local e a produção de prostanóides vasoconstrictores podem aumentar a ROS em aorta de ratos (Álvarez *et al.*, 2007). Com isso, tornou-se essencial a análise do comportamento do sistema renina-angiotensina local neste modelo experimental.

Desse modo, foi investigado se as ações vasculares induzidas pelo cádmio envolvia o sistema renina-angiotensina local. Para esta investigação foram realizados experimentos de reatividade vascular na presença do inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril, e também com o antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, Losartan. O enalapril e o losartan reduziram à resposta máxima a fenilefrina somente nos segmentos arteriais do grupo cádmio. Os efeitos do bloqueio da ECA com enalapril sugerem que o cádmio estimula a atividade da enzima conversora de angiotensina, gerando mais de angiotensina II, que é bloqueada por losartan. Portanto ocorre participação do sistema renina-angiotensina local na maior resposta contrátil a fenilefrina exercida pelo cádmio. Além disso, foi notado que esta resposta não se devia ao aumento do número de receptores AT<sub>1</sub>, pois a expressão deste receptor não foi alterada pela exposição ao cádmio.

Esses dados corroboram com dados da literatura onde já está bem esclarecida a participação do sistema renina angiotensina nos efeitos produzidos pelo cádmio em diferentes modelos experimentais (Boscolo & Carmignani, 1986; Skoczyńska 1995 e 1997; Skoczyńska *et al.*, 2001; Wróbel & Skoczyńska, 2002), em especial relacionado ao aumento de pressão arterial. Além disso, Fouad & Jresat (2011) demonstraram a influência do sistema renina angiotensina nos efeitos tóxicos do cádmio, destacando o efeito protetor do telmisartan, antagonista seletivo do receptor AT<sub>1</sub>, contra nefrotoxicidade induzida por cádmio em camundongos. Em 2013, os mesmos autores, demonstraram que o tratamento com captopril e telmisartan atenuou a toxicidade testicular induzida pelo cádmio em ratos, demonstrando novamente a importância do sistema renina angiotensina nos efeitos tóxicos da exposição a este metal.

Somado a isso, a angiotensina II, pode regular a expressão da COX-2, a produção de prostanóides (Álvarez *et al.*, 2007; Ohnaka *et al.*, 2000; Weseler & Bast, 2010) e atividade da NADPH oxidase (Griendling *et al.*, 1994). Sendo assim, deve-se considerar a relação existente entre aumento da liberação de angiotensina II, aumento da produção de prostanóides derivados da COX-2 e produção de radicais livres (Griendling *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2002; Ohnaka *et al.*, 2000, Tzotzes *et al.*, 2007).

Assim, podemos sugerir de acordo com os dados apresentados neste estudo que o aumento da liberação de angiotensina II induzida pelo cádmio pode causar o aumento da atividade de COX-2 e de NADPH-oxidase, juntos. Esses fatores poderiam aumentar a liberação de ROS, como foi observado neste trabalho contribuindo para a hiperatividade vascular induzida pela fenilefrina após exposição ao cádmio. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a exposição aguda

ao cádmio desencadeia a produção de ROS, que se ocorrendo repetidamente, poderia dar início a um processo inflamatório vascular e o desenvolvimento da aterosclerose na aorta.

Em suma, nossos resultados mostram que a exposição, *in vitro* a 10  $\mu$ M de cádmio, aumenta a resposta vascular a fenilefrina, possivelmente como resultado da redução da biodisponibilidade de NO devido ao aumento da liberação de ROS. Esse aumento da liberação de ROS é derivado especialmente da NADPH oxidase e pode ser devido ao aumento da liberação local de angiotensina II e liberação de prostanóides vasoconstrictores derivados da via da COX-2. Portanto, repetidas exposições ao cádmio poderiam induzir disfunção endotelial e contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e consequentemente na gênese e manutenção da hipertensão. Como consequência, os resultados reforçam a sugestão de que a exposição ao cádmio é um fator de alto risco para a saúde pública.

## **VI CONCLUSÃO**

A exposição aguda ao cádmio alterou a reatividade vascular promovendo aumento da resposta contrátil a fenilefrina e disfunção endotelial em segmentos de aorta;

A disfunção endotelial observada neste modelo experimental deve-se, mesmo que parcialmente, a redução da biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio produzidos pela NADPHoxidase;

O aumento da resposta contrátil a fenilefrina está associado a menor modulação do endotélio nesta resposta e a maior participação do ânion superóxido, derivado dos prostanóides contráteis derivados da COX-2 ( $PGE_2$  e  $TXA_2$ ) e do sistema renina-angiotensina nesta resposta;

Esses resultados demonstram que a exposição aguda ao  $CdCl_2$  promove alterações vasculares semelhantes às produzidas por outros fatores de risco cardiovascular como hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão. E reforçam a hipótese de que o cádmio deve ser considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

## VI REFERENCIAS

Abu-Hayyeh, S.; Sian, M.; Jones, K.G.; Manuel, A.; Powell, J.T. Cadmium accumulation in aortas of smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 863–867; 2001.

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2007.

Adeagbo, A.S.; Zhang, X.; Patel, D.; Joshua, I.G.; Wang, Y.; Sun, X.; Igbo, I.N.; Oriowo, M.A. Cyclo-oxygenase-2 endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J. Hypertens.*, 115: 1025-1036; 2005.

Afridi, H.I.; Kazi, T.G.; Kazi, N.G.; Jamali, M.K.; Arain, M.B.; Sirajuddin; Baig, J.A.; Kandhro, G.A.; Wadhwa, S.K.; Shah, A.Q. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and non smokers hypertensive patients. *J. Human Hypertension*, 24: 34-43, 2010.

Alfranca, A.; Iñiguez, M.A.; Fresno, M.; Redondo, J.M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.*, 70: 446-456; 2006.

Almenara, C. P. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio sobre a reatividade vascular e pressão arterial de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES; 2013.

Alsberg, C.L.; Schwartz, E.W. Pharmacological action of cadmium. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 13: 504-505, 1919.

Alvarez, S.M.; Gómez, N.N.; Scardapane, L.; Zirulnik, F.; Martínez, D.; Giménez, M.S. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. *Toxicol. Lett.*, 153: 365–376; 2004.

Alvarez, Y.; Briones, A.M.; Balfagón, G.; Alonso, M.J.; Salaices, M. Hipertensión increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J. Hypertens.*, 23(4): 767-777; 2005.

Alvarez, Y.; Pérez-Giron, J.V.; Herranz, R.; Briones, A.M.; García-Redondo, A.; Beltrán, A.; Alonso, M.J.; Salaices, M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321(1): 381-388; 2007.

Andrew, P.J.; Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.*, 43: 521-531; 1999.

Antala, S.; Dempski, R.E. The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. *Biochemistry* 51:963-73; 2012.

Antman, E.M.; DeMets, D.; Loscalzo, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation.*, 112: 759-770; 2005.

Aoki, A.; Hoffer, A.P. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.* 18(4):579-91; 1978.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium. U.S Department of Health and Human Services. *Public Health Service*; 2008.

Bader, M.; Peters, J.; Baltatu, O.; Muller, D.N.; Luft, F.C.; Ganten, D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med.*, 79:76 -102; 2001.

Bagchi, D.; Vuchetich, P.J.; Bagchi, M.; Hassoun, E.A.; Tran, M.X.; Tang, L.; Stohs, S.J. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radic. Biol. Med.* 22(3):471-8, 1997.

Balaraman, R.; Gulati, O.D.; Bhatt, J.D.; Rathod, S.P.; Hemavathi, K.G. Cadmium-induced hypertension in rats. *Pharmacology.* 38(4):226-34; 1989.

Banakou, E.; Dailianis, S. Involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 152:346–52; 2010.

Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(4):1620-1624; 1990.

Beckman, J.S.; Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 271: C1424-1437; 1996.

Bedard, K.; Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87:245–313; 2007.

Beltrán, A.E.; Briones, A.M.; García-Redondo, A.B.; Rodríguez, C.; Miguel, M.; Alvarez, Y.; Alonso, M.J.; Martínez-González, J.; Salaices, M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 27(1):142-54; 2009.

Bendell, L.I. Cadmium in shellfish: The British Columbia, Canada experience-A mini-review. *Toxicol. Lett.*, 198: 7–12; 2010.

Bergendi, L.; Benes, L.; Duracková, Z.; Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65 (18-19):1865-1874; 1999.

Bhatnagar, A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circ Res.* 99:692–705; 2006.

Bilgen, I.; Oner, G.; Edremitlioğlu, M.; Alkan, Z.; Cirrik S. Involvement of cholinergic receptors in cadmium-induced endothelial dysfunction. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 14(1):55-76; 2003.

Blaustein, M.P.; Hamlyn, J.M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na<sup>+</sup> pump, the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1802(12):1219-1229; 2010.

Boscolo, P.; Carmignani, M. [Mechanisms of cardiovascular regulation in male rabbits chronically exposed to cadmium.](#) *Br. J. Ind. Med.*, 43(9):605-10; 1986.



Bressler, J.P.; Olivi, L.; Cheong, J.H.; Kim, Y.; Bannona, D. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012:142–152; 2004.

Bulbring, E.; Tomita, T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, 39: 49–96; 1987.

Bunting, S.; Gryglewski, R.; Moncada, S.; Vane, J.R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and celiac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 12: 897 – 913; 1976.

Buzard, G.S.; Kasprzak, K.S. Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19(3):179-99; 2000.

Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas. Res.*, 68: 26-36; 2005.

Cai, H.; Griending, K.K.; Harrison, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.*, 24:471–8; 2003.

Cai, H.; Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidante stress. *Circ. Res.*, 87: 840-844; 2000.

Calles-Escandon, J.; Cipolla, M. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. *Endocr. Rev.*, 22(1):36–52; 2001.

Cannon III, R.O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the Endothelium. *Clin. Chem.* 44(8): 1809-1819; 1998.

Carageorgiou, H.; Tzotzes, V.; Sideris, A.; Zarros, A.; Tsakiris, S. Cadmium effects on brain acetylcholinesterase activity and antioxidant status of adult rats:

modulation by zinc, calcium and L-cysteine co-administration. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 97(5):320-4; 2005.

Carvalho, M.H.; Nigro, D.; Lemos, V.S.; Tostes, R.C.A.; Fortes, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.* 8: 76 – 88; 2001.

Cercla. Priority List of Hazardous Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). International Program on Chemical Safety (IPCS). Cadmium: Environmental Health Criteria 134, World Health Organization, Geneva, 1992.

Chatterjee, A.; Catravas, J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul. Pharmacol.*, 49 (4-6): 134-140; 2008.

Chimienti, F.; Devergnas, S.; Pattou, F.; Schuit, F.; Garcia-Cuenca, R.; Vandewalle, B.; Kerr-Conte, J.; Van Lommel, L.; Grunwald, D.; Favier, A.; Seve, M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J. Cell. Sci.*, 119: 4199-206; 2006.

Chiquoine, A.D. Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. *Anat. Rec.*, 149:23–35; 1964.

[Choi, J.H.](#); [Chang, H.W.](#); [Rhee, S.J.](#) Effect of green tea catechin on arachidonic acid cascade in chronic cadmium-poisoned rats. [\*Asia Pac. J. Clin. Nutr.\*](#), 11(4):292-7; 2002.

Ciolino, H.P.; Levine, R.L. Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 1277–1282; 1997.

Clemens, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie.*, 88 (11): 1707–1719; 2006.

Copes, R.; Clark, N.A.; Rideout, K.; Palaty, J.; Teschke, K. Uptake of cadmium from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in British Columbia oyster growers. *Environ. Res.*, 107 (2): 160-169; 2008.

Cuypers, A.; Plusquin, M.; Remans, T.; Jozefczak, M.; Keunen, E.; Gielen, H.; Opdenakker, K.; Nair, A.R.; Munters, E.; Artois, T.J.; Nawrot, T.; Vangronsveld, J.; Smeets, K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biomaterials*, 23(5):927-40; 2010.

Dalton, T.P.; He, L.; Wang, B.; Miller, M.L.; Jin, L.; Stringer, K.F.; Chang, X.; Baxter, C.S.; Nebert, D.W. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:3401–3406; 2005.

Danser, A.H.; Schalekamp, M.A. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart*, 76: 28 – 32; 1996.

Davalli, P.; Carpenè, E.; Astancole, S.; Viviani, R.; Corti, A. Cadmium induction of renal and hepatic ornithine decarboxylase activity in the rat. Effects of sex hormones and involvement of the renin–angiotensin system. *Biochem. Pharmacol.*, 44:721–6; 1992.

Davidge, S.T. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. *Circ. Res.*, 89: 650-660; 2001.

Degraeve, N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat. Res.*, 86:115–135; 1981.

Deschepper, C.F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int.*, 46:1561–1563; 1994.

Dias, F. M. V. Participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e dos canais para K<sup>+</sup> nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Tese de Doutorado em Ciências

Fisiológicas apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES; 2011.

Djukić-Cosić, D.; Curčić Jovanović, M.; Plamenac Bulat, Z.; Ninković, M.; Malicević, Z.; Matović, V. Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 22(1):66-72; 2008.

Dodson, G.; Steiner, D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:189-94; 1998.

Donpunha, W.; Kukongviriyapan, U.; Sompamit, K.; Pakdeechote, P.; Kukongviriyapan, V.; Pannangpetch, P. Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals.*, 24(1):105-15; 2011.

Doughan, A.K.; Harrison, D.G.; Dikalov, S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction. Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.*, 102: 488-496; 2008.

Dzau, V.J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. *J. Hypertens.*, 7: 933 -936; 1989.

Eddins, D.; Petro, A.; Pollard, N.; Freedman, J.H.; Levin, E.D. Mercury-induced cognitive impairment in metallothionein-1/2 null mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 30: 88-95; 2008.

El Muayed, M.; Raja, M.R.; Zhang, X.; Mac Renaris, K.W.; Bhatt, S.; Chen, X.; Urbanek, M.; O'Halloran, T.V. Lowe, W.L. Jr. Accumulation of cadmium in insulin-producing  $\beta$  cells. *Islets.*, 4(6):405-16; 2012.

El-Agha, O.; Gökmen, I.G. Smoking habits and cadmium intake in Turkey. *Biol. Trace Elem. Res.* Jul; 88(1): 31-43; 2002.

Ercal, N.; Gurer-Orhan, H.; Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 529–539; 2001.

Fadloun, Z.; Leach, G.D. The effects of  $\text{Cd}^{2+}$  on the myogenic activity and the responsiveness of the rat portal vein to perimural stimulation, noradrenaline and potassium ions [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.*, 68(1):181-182; 1980.

Féletou, M. & Vanhoutte, P.M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J. Physiol. Pharmacol.*, 50 (4): 525 – 534; 1999.

Fende, P.L.; Niewenhuis, R.J. An electron microscopic study of the effects of cadmium chloride on cryptorchid testes of the rat. *Biol. Reprod.* 16(3):298-305; 1977.

Figueiredo-Pereira, M.E.; Li, Z.; Jansen, M.; Rockwell, P. N-acetylcysteine and celecoxib lessen cadmium cytotoxicity which is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation in mouse neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 25283–25289; 2002.

FIT. Ficha de informação toxicologia. Cádmio e seus Compostos, CETESB; Janeiro de 2012.

Förstermann, U.; Closs, E.I.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Schwarz, P.; Gath, I.; Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.*, 23(6 Pt 2):1121-31; 1994.

Förstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.*, 33(7):829-37; 2012.

Fouad, A.A.; Jresat, I. [Protective effect of telmisartan against cadmium-induced nephrotoxicity in mice.](#) *Life Sci.*, 4;89(1-2):29-35; 2011.

[Fouad, A.A.](#); [Jresat, I.](#) Captopril and telmisartan treatments attenuate cadmium-induced testicular toxicity in rats. [Fundam. Clin. Pharmacol.](#), 27(2):152-60; 2013.

Fraga, G.; Shigenaga, M.K.; Park, J.W.; Degan, P.; Ames, B.N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:4533-4537; 1990.

Freeman, E.J.; Ruehr, M.L.; Dorman, R.V. Ang II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 274(1Pt1): C282-288; 1998.

Friberg, L.; Elinder, C.G.; Kjellström, T.; Nordberg, G.F. Cadmium and health, a toxicological and epidemiological appraisal. Vol. II. Effects and response, Cleveland, Ohio, CRC Press. 303; 1986.

Friberg, L.; Piscator, M.; Nordberg, M.B.. Cadmium In The Environment. Ohi: C. R. C Press, 248;1974.

Frolich, J.C. & Förstermann, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, 19: 211 – 215, 1989.

Funk, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*, 294:1871-1875; 2001.

Furchgott, R.F. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 53: 557 – 572; 1983.

Furchgott, R.F.; Carvalho, M.H.C.; Khan, M.T. Evidence for endothelium-dependent vasodilatation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels.*, 24: 145 – 149; 1987.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*, 288: 373 – 376; 1980.

Furchgott, R.F.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.*, 3: 2007 – 2017; 1989.

Gabbiani, G.; Badonnel, M.C.; Mathewson, S.M.; Ryan, G.B. Acute cadmium intoxication. Early selective lesions of endothelial clefts. *Lab. Invest.* 30:686–695; 1974.

Ganitkevich, V.Y.; Isenberg, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.*, 435: 187–205; 1991.

Gaut, J.P.; Byun, J.; Tran, H.D.; Lauber, W.M.; Carrol, J.A.; Hotchkiss, R.S.; Belaaouaj, A.; Heinecke, J.W. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J. Clin. Inves.*, 109: 1311-1319; 2002.

Gibbins, I.L.; Jobling, P.; Morris, J.L. Functional organization of peripheral vasomotor pathways. *Acta Physiol. Scand.*, 177:237–245; 2003.

Gökalp, O.; Ozdem, S.; Dönmez, S.; Dogan, M.; Demir, H.; Kara, H.Y.; Sütcü, R.; Cicek, E.; Ozer, M.K. Delibas N. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in cadmium-hypertensive rats. *Toxicol. Ind. Health.*, 25(7):447-53; 2009.

Goligorsky, M.S. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 288: F871-F880; 2005.

Gonçalves, L.; Alves, M.E.; Infrator, S. "FEEMA apura vazamento na Baía de Sepetiba", O Globo, Rio de Janeiro, 25/02/96, p.34; 1996.

Gongora, M.C.; Qin, Z.; Laude, K.; Kim, H.W.; McCann, L.; Folz, J.R.; Dikalov, S.; Fukai, T.; Harrison, D.G. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 48: 473-481; 2006.

Griendling, K.; Lassegue, B.; Alexander, R.W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36: 281–306; 1996.

Griendling, K.K.; FitzGerald, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.*, 108: 1912-1916; 2003.

Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 74, 1141–1148; 1994.

Griendling, K.K.; Sorescu, D.; Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 86: 494–501; 2000.

Gunn, S.A.; Gould, T.C. Cadmium and other mineral elements. In: Gomes, W.R.; Van Demark, N.L., editors. *The Testis. Academic Press; New York*: p. 377-481; 1970.

Hackenthal, E.; Ganten, P.M.; Taugner, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.*, 70: 1067–1116; 1990.

Hall, J.E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol. Biotechnol.*, 24: 27–39; 2003.

Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.*, 55(1):44-49; 1997.

Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic. Res. Cardiol.*, 89 (Suppl. 1): 87-102; 1994.

Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now: *Free Radic Biol Med* 33: 774-797, 2002.

Hassler, E.; Lind, B.; Piscator, M. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in an alkaline battery factory. *Br. J. Ind. Med.*, 40: 420-425; 1983.



Haswell-Elkins, M.; McGrath, V.; Moore, M.; Satarug, S.; Walmbey, M.; Ng, J. Exploring potential dietary contributions including traditional seafood and other determinants of urinary cadmium levels among indigenous women of a Torres Strait Island (Australia). *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 17(3): 298-306; 2007.

He, X.; Chen, M.G.; Ma, Q. Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 21:1375–1383; 2008.

Hill, C.E.; Phillips, J.K.; Sandow, S.L. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med. Res. Rev.*, 21:1–60; 2001.

Hoey, M.J. The effects of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. *J. Reprod. Fertil.*, 12:461–472; 1966.

Horowitz, A.; Menice, C.B.; Laporte, R.; Morgan, K.G. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.*, 76(4):967-1003; 1996.

Houtman, J.P. Prolonged low-level cadmium intake and atherosclerosis. *Sci. Total Environ.*, 138:31-6; 1993.

Hu, Z.W.; Kerb, R.; Shi, X.Y.; Wei-Lavery, T.; Hoffman, B.B. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2 implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303(2): 563-573; 2002.

Huang, X.F.; Arvan, P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J. Biol. Chem.* 270:20417-23; 1995.

Hudecova, A.; Ginter, E. The influence of ascorbic acid on lipid peroxidation in guinea pigs intoxicated with cadmium. *Food. Chem. Toxicol.* 30: 1011–1013; 1992.

IARC. Cadmium and cadmium compounds. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 58:119–237;1993.

Ignaro, L.J.; Buga, G.M.; Wood, K.S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 9265 – 9269; 1987.

Inaba, T.; Kobayashi, E.; Suwazono, Y.; Uetani, M.; Oishi, M.; Nakagawa, H.; Nogawa, K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol. Lett.*, 159(2): 192–201; 2005.

Jackson, W.F. Ion channels and vascular tone. *Hypertension.*, 35(1 Pt 2):173-8; 2000.

Jarup, L.; Berglund, M.; Elinder, C.G.; Nordberg, G.; Vahter, M. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health.*, 24 (Suppl 1):1–51; 1998.

Jin, Y.H.; Clark, A.B.; Slebos, R.J.; Al-Refai, H.; Taylor, J.A.; Kunkel, T.A.; Resnick, M.A.; Gordenin, D.A. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet.* 34(3):326-9, 2003.

Kamiyama, T.; Miyakawa, H.; Li, J.P.; Akiba, T.; Liu, J.H.; Liu, J.; Marumo, F., Sato, C. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 88(2):177-86; 1995.

Kar, A.B.; Das, R.P. Testicular changes in rats after treatment with cadmium chloride. *Acta Biol. Med. Ger.* 5:153–173; 1960.

Katsuyama, M. NOX/NADPH Oxidase, the Superoxide-Generating Enzyme: Its Transcriptional Regulation and Physiological Roles. *J. Pharmacol. Sci.*, 114:134-146; 2010.

Kerwin, J.F. JR.; Lancaster, J.R.; Feldman, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.* , 38(22): 4343-62; 1995.

Kifor, I. & Dzau, V.J. Endothelial rennin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. *Circ. Res.* 60: 422 – 428; 1987.

Kim, H.R.; Appel, S.; Vetterkind, S.; Gangopadhyay, S.S.; Morgan, K.G. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. *J. Cell Mol. Med.*, 12(6A): 2165–2180; 2008.

Kishimoto, T.; Oguri, T.; Yamabe, S.; Tada, M. Effect of cadmium injury on growth and migration of cultured human vascular endothelial cells. *Hum. Cells*, 9:43–48; 1996a.

Klaassen, C.D.; Liu, J.; Diwan, B.A. Metallothionein Protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3): 215-220; 2009.

Koh, K.K.; Oh, P.C.; Wuon, M.J. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc. Res.*, 81: 649-659; 2009.

Kolluru, G.K.; Siamwala, J.H.; Chatterjee. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 30:1-13; 2010.

Kolluru, G.K.; Tamilarasan, K.P.; Geetha Priya S.; Durgha, N.P.; Chatterjee, S. Cadmium induced endothelial dysfunction: consequence of defective migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. *Cell. Biol. Int.*, 30(5):427-38. 2006.

Koppenol, W.H.; Moreno, J.J.; Pryor, W.A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 834-842; 1992.

Kruzynski, G.M. Cadmium in oysters and scallops: the BC experience. *Toxicol. Lett.*, 148: 159-169; 2004.

Kundu, S.; Sengupta, S.; Chatterjee, S.; Mitra, S.; Bhattacharyya, A. Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *J. Inflamm.*, 6: 19; 2009.

Lall, S.B.; Peshin, S.S.; Gulati, K.; Khattar, S.; Das, N.; Seth, S.D. Involvement of renin–angiotensin system in hypertensive effect of cadmium in rats. *Indian. J. Exp. Biol.*, 35:338–91; 1997.

Laporte, R.; Hui, A.; Laher, I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, 56:439–513; 2004.

Lazo, J.S.; Pitt, B.R. Metallothioneins and cell death by anticancer drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53:635– 653; 1995.

Leist, M.; Single, B.; Castoldi, A.F.; Kühnle, S.; Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 185: 1481–1486; 1997.

Lemaire, K.; Ravier, M.A.; Schraenen, A.; Creemers, J.W.; Van de Plas, R.; Granvik, M.; Van Lommel, L.; Waelkens, E.; Chimienti, F.; Rutter, G.A.; Gilon, P.; in't Veld, P.A.; Schuit, F.C. Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106:14872-7; 2009.

Levesque, M.; Martineau, C.; Jumarie, C.; Moreau, R. Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 231:308 – 317, 2008.

Lincoln, T.M.; Dey, N.; Sellak, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J. Appl. Physiol.*, 91(3):1421-1430; 2001.

Liu, F.; Jan, K.Y. DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 28(1):55-63; 2000.

Liu, J.; Qu, W.; Kadiiska, M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1238: 209-214; 2009.

Liu, J.; Qian, S.Y.; Guo, Q.; Jiang, J.; Waalkes, M.P.; Mason, R.P.; Kadiiska, M.B. Cadmium generates reactive oxygen- and carbon-centered radical species in rats: insights from in vivo spin-trapping studies. *Free Radic. Biol. Med.*, 15;45(4):475-81; 2008.

Luoma, P.V.; Nayha, S.; Pyy, L.; Hassi, J. Association of blood cadmium to the area of residence and hypertensive disease in Arctic Finland. *Sci. Total Environ.*, 160–161:571–575; 1995.

Luz, C.P.; De Castro e Silva, E.; Marinho, C.A.; Castro, L.; Sarmento C.; Gonzalez, V.; Oliveira, P.; Nascimento, T.; Santana Júnior, P.; De Paula, S.; Lima, A.K.; Fregoneze, J.B. Natriuretic and kaliuretic effect of central acute cadmium administration in rats. *Brain Res.*, 796:265–272; 1998.

Manca, D., Ricard, A.C.; Tra, H.V.; Chevalier, G. Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Arch. Toxicol.*, 68(6):364-9; 1994.

Marano, K.M.; Naufal, Z.S.; Kathman, S.J.; Bodnar, J.A.; Borgerding, M.F.; Garner, C.D.; Wilson, C.L. Cadmium exposure and tobacco consumption: Biomarkers and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Nov; 64(2): 243-52; 2012.

Mardini, I.A.; FitzGerald, G.A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. *Mol. Interv.*, 1: 30-38; 2001.

Marín, J.; Rodríguez-Martínez, M.A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.*, 15(4): 279-307; 1995.

Marín, J.; Sanchez-Ferrer, C.F. Role of endothelium formed nitric oxide on vascular responses. *Gen. pharmacol.*, v. 21:575-587; 1990.

Marín J, Sánchez-Ferrer, CF; Salaices, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol.* 93: 43-52; 1988.

Martín, M.C.; Balfagón, G.; Minoves, N.; Blanco-Rivero, J.; Ferrer, M. Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide.*,12:163-176; 2005.

Martynowicz, H., Skoczyńska, A., Wojakowska, A., Turczyn, B. Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*, 17(4):479-85; 2004.

Maturana, M.A.; Irigoyen, M.C.; Spritzer, P.M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics.* 62:77-866; 2007.

McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.*, 5(5-6):363-369; 1988.

McIntyre, M.; Bohr, D.F.; Dominiczak, A.F. Endothelial function in Hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension.*, 34: 539-545; 1999.

Mead, M.N. Cadmium confusion: Do consumers need protection?. *Environ. Health Perspect.*, 118(12): a528-34; 2010.

Meijer, G.W.; Beems, R.B.; Janssen, G.B.; Vaessen, H.A.; Speijers, G.J. Cadmium and atherosclerosis in the rabbit: reduced atherogenesis by superseding of iron. *Food. Chem. Toxicol.* 34: 611–621; 1996.

Mendham, N.J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K. VOGEL. Análise Química Quantitativa; 6ª edição, LTC; 2011.

Messner, B.; Knoflach, M.; Seubert, A.; Ritsch, A.; Pfaller, K.; Henderson, B, et al. Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis

mechanisms and in vivo relevance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:1392–1398; 2009.

Mitra, S.; Deshmukh, A.; Sachdeva, R.; Lu, J.; Mehta, J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am. J. Med. Sci.* 342: 135–142; 2011.

Miyahara, T.; Tonoyama, H.; Watanabe, M.; Okajima, A.; Miyajima, S.; Sakuma, T.; Nemoto, N.; Takayama, K. Stimulative effect of cadmium on prostaglandin E<sub>2</sub> production in primary mouse osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.*, 68: 185–191; 2001.

Moncada, S. Nitric oxide. *J Hypertens Suppl.*, 12(10): 35-39; 1994.

Moncada, S.; Herman, A.G.; Higgs, E.A.; Vane, J.R. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.*, 11: 323 – 344; 1977.

Mueller, C.F.; Laude, K.; McNally, J.S.; Harrison, D.G. Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2: 274-278; 2005.

Nakae, D.; Kobayashi, Y.; Akai, H.; Andoh, N.; Satoh, H.; Ohashi, K.; Tsutsumi, M.; Konishi, Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res.*, 57:1281-1287; 1997.

Navas-Acien, A.; Silbergeld, E.K.; Sharrett, R.; Calderon-Aranda, E.; Selvin, E.; Guallar, E. Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environ. Health Perspect.*; 113:164 –169; 2005.

Navas-Acien, A.; Selvin, E.; Sharrett, A.R.; Calderon-Aranda, E.; Silbergeld, E.; Guallar, E. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation.*, 109(25):3196-201; 2004.

Nation, J.R.; Baker, D.M.; Bratton, G.R.; Fantasia, M.A.; Andrews, K.; Womac, C. Ethanol self administration in rats following exposure to dietary cadmium. *Neurotoxicol. Teratol.* 9: 339–344; 1987.

NCM. Nordic Council of Ministers. Cadmium nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.*, 145: 121– 132; 2003.

Nolan, C.V.; Shaikh, Z.A. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci.* 39: 1403–1409; 1986.

Nordberg, G.F.; Nogawa, K.; Nordberg, M.; Friedmann, J.M. Cadmium. In: Handbook on the Toxicology of Metals. *Amsterdam: Elsevier*, 445–486; 2007.

Nordberg, G.F. [Cadmium and health in the 21st century--historical remarks and trends for the future.](#) *Biometals.*,17(5):485-9; 2004.

Nriagu, J.; Pacyna, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333:134-139; 1988.

Nriagu, J.O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338: 47-48; 1989.

Ohnaka, K.; Numaguchi, K.; Yamakawa, T.; Inagami, T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.*, 35: 68–75; 2000.

Ohtsu, H.; Frank, G.D.; Utsunomiya, H.; Eguchi, S. Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxid. Redox. Signal.*, 7: 1315–1326; 2005.

[Olszowski, T.](#); [Baranowska-Bosiacka, I.](#); [Gutowska, I.](#); [Chlubek, D.](#) Pro-inflammatory properties of cadmium. [Acta Biochim. Pol.](#),59(4):475-82; 2012.



Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327: 524 – 526; 1987.

Paoliello, M.M.; Gutierrez, P.R.; Turini, C.A.; Matsuo, T.; Mezzaroba, L.; Barbosa, D.S.; Carvalho, S.R.; Alvarenga, A.L.; Rezende, M.I.; Figueiroa, G.A.; Leite, V.G.; Gutierrez, A.C.; Lobo, B.C.; Cascales, R.A. Reference values for lead in blood in urban population in southern Brazil. *Rev. Panam. Salud. Publica.*, 9(5):315-9; 2001.

Parizek, J.; Zahor, K. Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature*, 177:1036; 1956.

Paul, M.; Mehr, A.P.; Kreutz, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.*, 86: 747 – 803; 2006.

Pauletto, P.; Rattazzi, M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 21(4): 850-853; 2006.

Peçanha, F.M. A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxygenase. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES; 2009.

Persson, P.B.; Skälweit, A.; Thiele, B.J. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol. Scand.*, 181: 375–381; 2004.

Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; DeTata, V.; Casini, A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.*, 15;66(8):1499-503; 2003.

Prozialeck, W.C.; Edwards, J.R.; Nebert, D.W.; Woods, J.M.; Barchowsky, A.; Atchison, W.D. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol. Sci.* 102(2):207-18; 2008.

Prozialeck, W.C.; Edwards, J.R.; Woods, J.M. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.*, 79:1493–1506; 2006.

Quinn, S.J.; Williams, G.H. Regulation of aldosterone secretion. *Annu. Rev. Physiol.*, 50: 409–426; 1988.

Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, G.A.; Griending, K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 97: 1916–1923; 1996.

Ramirez, D.C.; Gimenez, M.S. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.*, 145(2):121-32; 2003.

Ratz, P.H.; Berg, K.M.; Urban, N.H.; Miner, A.S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288: C769–C783; 2005.

Riederer, A.M.; Belova, A.; George, B.J.; Anastas, P.T. Urinary cadmium in the 1999-2008 U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environ. Sci, Technol.* 15;47(2):1137-47; 2013.

Rockwell, P.; Martinez, J.; Papa, L.; Gomes, E. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cell. Signal.* 16: 343–353; 2004.

Roels, H.; Djubgang. J.; Buchet, J.P.; Bernard, A.; Lauwerys, R.R. Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*. 8: 191-200; 1982.

Romare, A.; Lundholm, C.E. Cadmium-induced calcium release and prostaglandin E2 production in neonatal mouse calvaria are dependent on COX-2 induction and protein kinase C activation. *Arch. Toxicol.*, 73: 223–228;1999.

Rubanyi, G.M.; Vanhoute, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.*, 250: H82-H827; 1986.

Rubanyi, G.M. The role endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 22 (4): 1-14; 1993.

Rubanyi, G.M.; & Vanhoutte, P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 250 (19): H815 - H821; 1986.

Russel, J. B. **Química geral**. São Paulo ed., Makron Books, 2004.

Sacerdote, L.; Cavicchia, J.C. Ultrastructural effects of cadmium on the rat epididymis. *Int. J. Androl*. 6:533–540; 1983.

Satarug, S.; Baker, J.R.; Urbenjapol, S.; Haswell-Elkins, M.; Reilly, P.E.B.; Williams, D.J.; Moore, M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.*, 137 (1-2);, 65-83; 2003.

Satarug, S.; Nishijo, M.; Ujjin, P.; Vanavanitkun, Y.; Moore, M.R. Cadmium induced nephropathy in the development of high blood pressure. *Toxicol. Lett.* 157:57–68; 2005.

Satarug, S.; Garrett, S.H.; Sens, M.A.; Sens, D.A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Perspect.* Feb;118(2):182-90; 2010.

Schiffrin, E.L. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc. Pharmacol.*, 43:19-29; 2005.

Schwartz, G.G.; Il'yasova, D.; Ivanova, A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care*, 26:468-70; 2003.

Seok, S.M.; Park, D.H.; Kim, Y.C.; Moon, C.H.; Jung, Y.S.; Baik, E.J.; Moon, C.K.; Lee, S.H. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. *Toxicol. Lett.*, 165: 212–220; 2006.

Shin, H.J.; Park, K.K.; Lee, B.H.; Moon, C.K.; Lee, M.O. Identification of genes that are induced after cadmium exposure by suppression subtractive hybridization. *Toxicology.*, 191: 121–131; 2003.

Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front. Physiol.*, 3:441; 2012.

Sindhu, R.K.; Ehdaie, A.; Farman, F.; Dhaliwal, K.K.; Nguyen, T.; Zhan, C.D.; Roberts, C.K.; Varizi, N.D. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1743: 86-92; 2005.

Siow, R.C.; Ishii, T.; Sato, H.; Taketani, S.; Leake, D.S.; Sweiry, J.H.; Pearson, J.D.; Bannai, S.; Mann, G.E. Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidised LDL in cultured vascular smooth muscle cells. *Febs. Lett.* 17;368(2):239-42; 1995.

Skoczńska, A. [Effect of angiotensin II on the reactivity of isolated mesenteric vessels to norepinephrine in rats poisoned with cadmium.](#) *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*,10(1):67-77; 1997.

Skoczyńska, A. [Renin-angiotensin-aldosterone system in chronic poisoning of rats with lead and cadmium](#). *Med. Pr.*, 46(3):239-46; 1995.

Skoczyńska, A.; Wróbel, J.; Andrzejak, R. [Lead-cadmium interaction effect on the responsiveness of rat mesenteric vessels to norepinephrine and angiotensin II](#). *Toxicology*. 21;162(3):157-70; 2001.

Skoczynska, A.; Martynowicz, H. The impact of subchronic cadmium poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 24(7):353-61; 2005.

[Skoczyńska, A.](#); [Wróbel, J.](#); [Andrzejak, R.](#) Lead-cadmium interaction effect on the responsiveness of rat mesenteric vessels to norepinephrine and angiotensin II. [Toxicology](#), 162(3):157-70; 2001.

Smith, W.L.; Garavito, R.M.; DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 271: 33157–33160; 1996.

Somlyo, A.V.; Somlyo, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 159(1):129-45; 1968.

Sompamit, K.; Kukongviriyapan, U.; Donpunha, W.; Nakmareong, S.; Kukongviriyapan, V. Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. *Toxicol. Lett.*, 198(1):77-82; 2010.

[Souza, V.](#); [Escobar Mdel, C.](#); [Bucio, L.](#); [Hernández, E.](#); [Gómez-Quiroz, L.E.](#); [Gutiérrez Ruiz, M.C.](#) NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicol. Lett.*, 187:180–6; 2009.

Steckelings, U.M.; Kaschima, E.; Unger, T. The AT2 receptor: a matter of love and hate. *Peptides*, 26:1401–1409; 2005.

Stohs, S.J.; Bagchi, D.; Hassoun, E.; Bagchi, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 20(2):77-88; 2001.

Stull, J.T.; Gallagher, P.J.; Herring, B.P.; Kamm, K.E. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension*. 17(6 Pt 1):723-32; 1991.

Suzuki, H.; Motley, E.D.; Frank, G.D.; Utsunomiya, H.; Eguchi, S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.*, 3: 305–322; 2005.

Suzuki, Y.; Morita, I.; Ishizaki, Y.; Yamane, Y.; Murota, S. Cadmium stimulates postaglandin E2 synthesis in osteoblast-like cells, MC3T3-E1. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1012: 135–139; 1989.

Szasz, T.; Thakali, K.; Fink, G.D.; Watts, S.W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. *Exp. Biol. Med.*, 232: 27-37; 2007.

Szocs, K.; Lassegue, B.; Sorescu, D.; Hilenski, L.L.; Valppu, L.; Couse, T.L.; Wilcox, J.N.; Quinn, M.T.; Lambeth, J.D.; Griending, K.K. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 21-27; 2002.

Szuster-Ciesielska, A.; Lokaj, I.; Kandefer-Szerszen, M. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. *Toxicology.*, 145:135–145; 2000.

Takahashi, Y.; Poteser, M.; Masui, H.; Koizumi, N.; Wakabayashi, I. Effects of cadmium in vitro on contractile and relaxant responses of isolated rat aortas. *Environ. Health Prev. Med.*, 9(6):251-6; 2004.

Taylor, S.G. & Weston, A.H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci.* 9: 272 – 274; 1988.

Tellez-Plaza, M.; Navas-Acien, A.; Crainiceanu, C.M.; Guallar, E.; Cadmium exposure and hypertension in the 1999 –2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environ. Health Perspect.* 116:51–56; 2008.

Terminella, C.; Tollefson, K.; Kroczyński, J.; Pelli, J.; Cutaia, M. Inhibition of apoptosis in pulmonary artery endothelial cells by altered pH, mitochondrial function and ATP supply. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 283: L1291–L1302; 2002.

Tian, W.N.; Braunstein, L.D.; Apse, K.; Pang, J.; Rose, M.; Tian, X.; Stanton, R.C. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.*, 276: C1121–C1131; 1999.

Triggle, C.R.; Hollenberg, M.; Anderseon, T.J.; Ding, H.; Jiang, Y.; Ceroni, L.; Wiehler, W.B.; Ng, E.S.; Ellis, A.; Andrews, K.; McGuire, J.J.; Pannirselvam, M. The endothelium health and disease – a targeted for therapeutic intervention. *J. Smooth. Muscle. Res.*, 39: 249-267; 2003.

Tzotzes V.; Tzilalis, V.; Giannakakis, S.; Saranteas, T.; Papas, A.; Mourouzis, I.; Mourouzis, C.; Zarros, A.; Pantos, C.; Cokkinos, D.; Carageorgiou, H. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. *Biometals.*, 20(1), 83-91; 2007.

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160: 1-40; 2006.

Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12(10):1161-208; 2005.

Vane, J.R.; Botting, R.M. Formation by the endothelium of prostacyclin, nitric oxide and endothelin. *J. Lipid. Mediat.*, 6: 395-404; 1993.

Vane, J.R.; Mitchell, J.A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtall, J.; Willoughby, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:2046–2050;1994. environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25: 1-24; 1995.

Vanhoutte, P.M. Endothelial Dysfunction: The first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.*, 73: 595 – 601; 2009.

Vanhoutte, P.M. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation.*, 87 (suppl V): V9 - V17; 1993.

Vanhoutte, P.M.; Feletou, M.; Taddei, S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 144: 449 – 458; 2005.

Varoni, M.V.; Palomba, D.; Macciotta, N.P.; Antuofermo, E.; Deiana, G.; Baralla, E.; Anania, V.; Demontis, M.P. Brain renin–angiotensin system modifies the blood pressure response to intracerebro ventricular cadmium in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 33:302–9; 2010.

Vásquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B.; Martasek, P.; Hogg, N.; Masters, B.S.; Karoui, H.; Tordo, P.; Pritchard, K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 9220-9225; 1998.

Villar, I.C.; Francis, S.; Webb, A.; Hobbs, A.J.; Ahluwalia, A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* 70:840–853; 2006.

Vivoli, G.; Bergomi, M.; Borella, P.; Fantuzzi, G.; Caselgrandi, E. Cadmium in blood, urine and hair related to human hypertension. *J Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3:139–145; 1989.



Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3):95-117. 2003.

Watkin, R.D.; Nawrot, T.; Potts, R.J.; Hart, B.A. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 184(2-3):157-78; 2003.

Weseler, A.R.; Bast, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr. Hypertens. Rep.*, 12(3):154-61; 2010.

WHO, Preventing Disease through Healthy Environments: Action Is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern, World Health Organization.; 2010.

Whyte, A.L.; Hook, G.R.; Greening, G.E.; Gibbs-Smith, E.; Gardner, J.P. Human dietary exposure to heavy metals via the consumption of greenshell mussel (*Perna canaliculus* Gmelin 1791) from the Bay of Islands, northern New Zealand. *Sci. Total Environ.*, 407(14): 4348-4355; 2009.

Widlansky, M.E.; Gokce, N.; Keaney, Jr.; Vita, J.A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42: 1149-1160; 2003.

Wolf, G. Free radical production and angiotensin. *Curr. Hypertens.*, 2: 167-173; 2000.

Wolf, M.B.; Baynes, J.W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals.*, 20:73–81; 2007.

Wong, S.L.; Leung, F.P.; Lau, C.W.; Au, C.L.; Yung, L.M.; Yao, X.; Chen, Z.Y.; Vanhoutte, P.M.; Gollasch, M.; Huang, Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2 alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ. Res.*, 104(2): 228-235; 2009.

Woods, J.M.; Leone, M.; Klosowska, K.; Lamar, P.C.; Shaknovsky, T.J.; Prozialeck, W.C. Direct antiangiogenic actions of cadmium on human vascular endothelial cells. *Toxicol. In Vitro.*, 22(3):643-51; 2008.

World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 134 Cadmium. International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.

World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva. (Technical Report Series 837); 1993.

Wright, D.H.; Abran, D.; Bhattacharya, M.; Hou, X.; Bernier, S.G.; Bouayad, A.; Fouron, J.C.; Vázquez-Tello, A.; Beauchamp, M.H.; Clyman, R.I.; Peri, K.; Varma, D.R.; Chemtob, S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 281: R1343 - R1360; 2001.

Wróbel, J.; Skoczyńska, A. [The activity of angiotensin converting enzyme in vascular mesenteric bed of rats poisoned with lead and cadmium.](#) *Med. Pr.* 53(2):131-6; 2002.

Wu, K.K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv. Pharmacol.*, 33:179–207; 1995.

Yanagisawa, M.; Kurihara, S.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*. 322: 411- 415; 1988.

Yang, S.; Graham, J.; Kahn, J.W.; Schwartz, E.A.; Gerritsen, M.E. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am. J. Pathol.* 155:887–895; 1999.

Yiin, S.J.; Chern, C.L.; Sheu, J.Y.; Lin, T.H. Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals.*, 12(4):353-9; 1999.

Yoopan, N.; Watcharasit, P.; Wongsawatkul, O.; Piyachaturawat, P.; Satayavivad, J. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Toxicol. Lett.*, 30;176(2):157-61; 2008.

Zerrouk, A.; Auguet, M.; Chabrier, P.E. Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31: 525-533;1998.

Zinkevich, N.S.; Gutterman, D.D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 301(3):H647-53; 2011.